

537, 292

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際特許願

02 JUN 2005

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年6月17日 (17.06.2004)

PCT

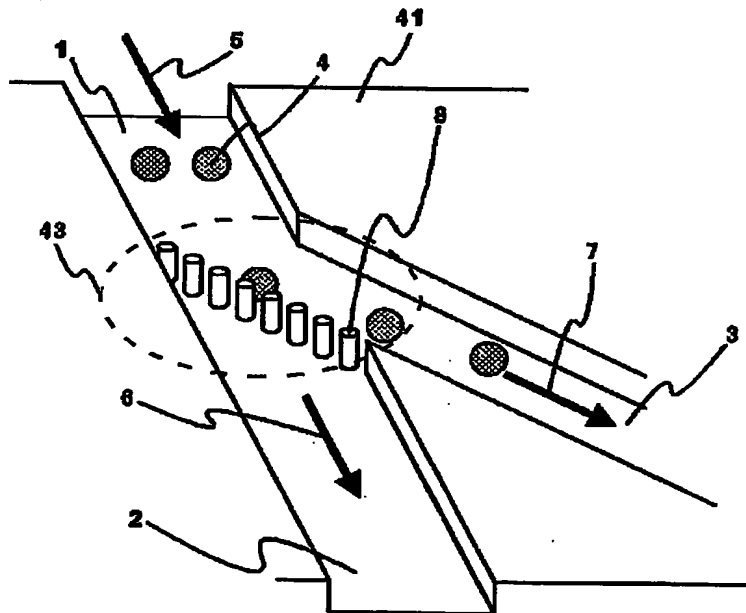
(10) 国際公開番号
WO 2004/051230 A1

- (51) 国際特許分類⁷: G01N 1/10, 27/26, 27/62, 33/48, 35/08, 37/00, B01D 57/00, 57/02, B81C 1/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/015031
- (22) 国際出願日: 2003年11月25日 (25.11.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
 特願2002-349492 2002年12月2日 (02.12.2002) JP
 特願2003-130834 2003年5月8日 (08.05.2003) JP
 特願2003-389566 2003年11月19日 (19.11.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日本電気株式会社 (NEC CORPORATION) [JP/JP]; 〒108-8001 東京都港区芝五丁目7番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 服部 渉 (HATTORI, Wataru) [JP/JP]; 〒108-8001 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP). 馬場 雅和 (BABA, Masakazu) [JP/JP]; 〒108-8001 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP). 佐野 亨 (SANO, Toru) [JP/JP]; 〒108-8001 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP). 飯田 一浩 (IIDA, Kazuhiro) [JP/JP]; 〒108-8001 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP). 川浦 久雄 (KAWAURA, Hisao) [JP/JP]; 〒108-8001 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP). 井口 憲幸 (IGUCHI, Noriyuki) [JP/JP]; 〒108-8001 東京都港

[続葉有]

(54) Title: FINE PARTICLE HANDLING UNIT, CHIP AND SENSOR MOUNTED WITH SAME, AND METHODS FOR SEPARATING, CAPTURING AND SENSING PROTEIN

(54) 発明の名称: 微粒子操作ユニット、それを搭載したチップと検出装置、ならびにタンパク質の分離、捕獲、および検出方法



(57) Abstract: A channel (1) formed in a substrate (41) branches into channels (2, 3) at a branch point (43). On this branch point, obstacles (8) having a columnar structure are aligned at certain intervals.

(57) 要約: 基板 (41) 上に形成された流路 (1) が、分岐点 (43) において流路 (2) と流路 (3) とに分岐する構成とする。そして、流路 (1) と流路 (2)、及び流路 (3) の分岐点には、柱状構造の妨害体 (8) を一定の間隔を設けて配列する。

WO 2004/051230 A1



区芝 五丁目7番1号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP).
染谷 浩子 (SOMEYA,Hiroko) [JP/JP]; 〒108-8001 東京
都 港区芝 五丁目7番1号 日本電気株式会社内 Tokyo
(JP).

(74) 代理人: 速水 進治 (HAYAMI,Shinji); 〒150-0021 東京
都 渋谷区恵比寿西 2-17-8 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): CN, US.

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

作ユニット、それを搭載したチップと検出装置、
にタンパク質の分離、捕獲、および検出方法

技術分野

本発明は、微粒子操作ユニット、それを搭載したチップと検出装置、なら
びにタンパク質の分離、捕獲、および検出方法に関する。

10 背景技術

近年、マイクロ・エレクトロメカニカル・システム（MEMS）技術の
発展により、特にバイオMEMS分野でマイクロ流路を利用した微粒子の処
理への応用が試みられている。たとえば、従来高分子ゲルを使用していた電
気泳動用の妨害体を微細加工技術で作製した分画装置が提案されている（特
15 許文献1）。これにより、従来の高分子ゲルの調製の手間が無くなる、再現
性が向上する等の産業利用上の利点が見出されていた。しかしながら、マイ
クロ流路を利用した微粒子の処理装置はその処理量が極めて少ないという
課題があった。

これを解決するために、連続的に微粒子の処理を行う方法が提案されてい
る（特許文献2）。特許文献2記載の技術においては、電気泳動を行うため
20 の緩衝液を連続的に流しながら、その流れに対して直角に電界を印加し、緩
衝液中の生体分子の泳動を行うことにより、微粒子の一種である生体分子の
連続的な分離を実現している。この連続的な処理により、処理時間を長く取
る事によって処理量が極めて少ないという制約を排除することができる。

25 一方、妨害体の作製に微細加工技術を利用する試みもなされている（非特
許文献1）。非特許文献1に記載の方法では、流れに対して非対称の形状を
有する妨害体の規則格子を用いて、連続的に微粒子の分離を行っている。

ところが、これらの従来の技術には以下のような課題があった。特許文献

2 記載の技術においては、ポンプにより緩衝液を流しながら電気泳動を行い、その速度により分離角度が決定されるため、脈動するポンプにより緩衝液の流速が変動し、この流速の変動に分離能が著しく左右されていた。

また、非特許文献 1 に記載のデバイスでは妨害体が固定されているため、
5 特許文献 2 記載の方法と比較すると、より安定に分離が行える。しかし、妨害体の形状に分離性能が依存しているため、生体分子のように、分子レベルの大きさを有する微細な粒子に対応することが困難であった。たとえばタンパク質のように粒径が 50 nm 以下の微粒子を分離する場合、妨害体の形状にはより高い精度が求められるが、このような微細な形状を精度良く作製する
10 ことは、現状の微細加工技術では困難であった。また、細胞などのミリメートルオーダーの微粒子を分離する場合においても、分離する微粒子のサイズに対して妨害体の形状に求められる加工精度が高いため、その加工精度を実現可能な高価な加工技術を必要としていた。

特許文献 1 特表平 9-504362 号公報

15 特許文献 2 特開 2002-195982 号公報

非特許文献 1 Chia-Fu Chou ら、Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (UNITED STATES)、1999 年、96 巻、24 号、p. 1
20 3762-13765

発明の開示

本発明は上記事情に鑑みてなされたものであり、その目的は、マイクロ流路内で液体中の微粒子の流れを操作する微粒子操作ユニット、チップ、およびタンパク質の処理方法を提供することにある。
25

本発明によれば、基板と、該基板上に形成された、第一の流路および該第一の流路から分岐する第二の流路を含む流路と、を備え、前記流路内の液体中を流動する微粒子の流動方向を操作する微粒子操作ユニットであって、前

記第一の流路から一以上の前記第二の流路が分岐する分岐点近傍の前記第一の流路中に、前記微粒子の少なくとも一部に対し透過を制限する透過制限領域を備えることを特徴とする微粒子操作ユニットが提供される。

本発明において、「微粒子」とは、ミリメートルオーダー以下の大きさを有する分子または原子、あるいは集合体であって、たとえば金属微粒子、半導体微粒子、高分子樹脂、細胞、生体高分子等を含む。このうち生体高分子には、タンパク質、核酸、多糖、脂質およびこれらの複合体を含む。また、「微粒子の操作」とは、主として流路内における微粒子の流れの方向や経路を調節する操作をいう。微粒子の流れを制御することにより、分離、濃縮、希釈、脱塩、溶媒置換等様々な処理が可能となる。

本発明に係る微粒子操作ユニットは、流路中に制限透過領域を備える。このため、第一の流路と第二の流路とが分岐する分岐点よりも下流側への微粒子の移動を制限することができる。第一の流路から透過制限領域に至った液体中の微粒子のうち、所定の形状、大きさの微粒子のみが透過制限領域を透過し、第一の流路の下流側へと導かれる。また、液体中に含まれる微粒子のうち、特定の微粒子、すなわち透過制限領域を透過することができない微粒子の流動方向を操作し、このような粒子のみを第二の流路へと導くことが可能となる。このように、本発明に係る微粒子操作ユニットによれば、液体中の微粒子の流れる方向を簡便に効率よく制御することが可能となる。

本発明の微粒子操作ユニットにおいて、前記透過制限領域は、離間して配置された複数の妨害体を有する構成とすることができる。この構成により、妨害体の間隙を透過することが可能な微粒子と不可能な微粒子とを、微粒子の表面の性質や形状、大きさ、変形のしやすさ等に基づいて分離することができる。

本発明の微粒子操作ユニットにおいて、隣接妨害体間の間隙が、前記微粒子の一部を透過する大きさに設定された構成とすることができる。この構成により、第一の流路中の液体に含まれる微粒子を、その形状、大きさに基づき確実に分離することが可能となる。

本発明の微粒子操作ユニットにおいて、前記微粒子の流動を形成する力の方向と、前記透過制限領域の前記分岐点側の最前面における前記妨害体の配列方向とが、非直角または非平行となるように前記妨害体が配置された構成とすることができる。

- 5 ここで、「透過制限領域の分岐点側の最前面における妨害体の配列方向」とは、第一の流路の下流側から妨害体の配列を見た際に、最前面に位置する妨害体を結ぶ方向を指す。この配列方向と、微粒子の流動を形成する力の方向を非直角とすることにより、透過制限領域を透過することができない微粒子が、透過制限領域近傍に堆積することを抑制し、効率よく第二の流路中へ
10 と導くことができる。また、非平行とすることにより、液体中の微粒子のうち、透過制限領域を通過できる形状、大きさ等を有する微粒子について、確実に透過制限領域を通過させることができる。

- 本発明の微粒子操作ユニットにおいて、前記複数の妨害体の配列により前記微粒子の流動方向を制御し前記微粒子の少なくとも一部を前記第一の流
15 路または前記第二の流路のいずれかに導く構成とすることができる。この構成により、複数の妨害体の配列を利用して微粒子を所定の流路に導くことができる。従って、第一の流路に導かれる微粒子と第二の流路に導かれる微粒子とを確実に分離することができる。

- 本発明の微粒子操作ユニットにおいて、前記妨害体が、平面的に周期的に
20 配置されている構成とすることができる。この構成により、より一層精度の高い処理が可能となる。

- 本発明によれば、基板と、該基板上に形成された、主流路および該主流路から前記主流路の下流側に向かって分岐する一以上の副流路を含む流路と、を備え、前記流路内を流動する微粒子の流動方向を操作する微粒子操作ユニ
25 ットであって、前記主流路から一以上の前記副流路が分岐する分岐点の上流側に流動制御部を備え、前記流動制御部は、前記微粒子の流動方向を制御し前記微粒子の少なくとも一部を前記主流路または前記副流路のいずれかに導くことを特徴とする微粒子操作ユニットが提供される。

本発明に係る微粒子操作ユニットによれば、主流路から副流路が分岐する分岐点の上流側に流動制御部が形成されているため、分岐点に導入された微粒子をその表面の性質、形状、大きさ、変形のしやすさ、等に基づいていずれかの副流路に誘導することができる。したがって、複数の微粒子を含む液体中の各成分を所望の副流路に分配することが可能となる。

本発明の微粒子操作ユニットにおいて、前記流動制御部は複数の妨害体を有し、該複数の妨害体の配列により前記微粒子の流動方向を制御し、前記微粒子の少なくとも一部を前記主流路または前記副流路のいずれかに導く構成とすることができる。この構成により、複数の妨害体の配列を利用して微粒子を所定の流路に導くことができる。従って、主流路に導かれる微粒子と副流路に導かれる微粒子とを確実に分離することができる。

本発明の微粒子操作ユニットにおいて、前記流動制御部は、周期的に配置された複数の妨害体を有する構成とすることができる。この構成により、妨害体の間隙を透過することが可能な微粒子と不可能な微粒子とを、微粒子の表面の性質や形状、大きさ、変形のしやすさ等に基づいて分離することができる。

本発明の微粒子操作ユニットにおいて、前記流動制御部における隣接妨害体間の間隙が、前記主流路の形成方向と、前記副流路の形成方向とで異なる構成とすることができる。ここで、主流路または副流路の形成方向についての「隣接妨害体間の間隙」とは、流路の形成方向に対して垂直な断面における妨害体間の間隙のことを指す。主流路と副流路とでこの間隙が異なる構成とすることにより、流動制御部中の微粒子の形状、大きさ等に基づき確実に各副流路または主流路へと分配させることができる。

本発明によれば、基板と、該基板上に形成された流路と、を備え、前記流路内を流動する微粒子の流動状態を操作する微粒子操作ユニットであって、前記流路中に、トレンチが流路壁面に形成された流動制御部を有し、前記微粒子の少なくとも一部を所定の方向に導くことを特徴とする微粒子操作ユニットが提供される。

本発明に係る微粒子操作ユニットによれば、流動制御部にトレンチが形成されているため、トレンチの形状や形成方向に基づき、流路中の液体に含まれる微粒子のうち、トレンチと相互作用することができる微粒子をトレンチとの相互作用の大小に従って選択的に所望の方向に誘導することが可能となる。したがって、複数の微粒子を含む液体中の特定の成分について、分離、濃縮等の所定の処理を行うことができる。

なお、本発明において、微粒子の流動状態として、たとえば流動方向または流動速度が挙げられる。

本発明に係る微粒子操作ユニットにおいて、前記トレンチが流路壁面に周期的に形成された流動制御部を有する構成とすることができる。この構成により、流路の壁面に形成されたトレンチの配列を利用してトレンチの配列を利用してより一層確実に微粒子の流動を制御することができる。

本発明の微粒子操作ユニットにおいて、前記流動制御部は、前記トレンチの開口形状または前記トレンチの間隔の異なる複数の周期パターンを含む構成とすることができる。この構成により、微粒子の流動をより一層精密に制御することができる。

本発明の微粒子操作ユニットにおいて、前記複数の周期パターンは、前記流動制御部において鏡映対称に形成された構成とすることができる。この構成により、液体中の所定の微粒子を、流路中の特定領域に濃縮することが可能となる。

本発明によれば、基板と、該基板上に形成された流路と、を有し、前記流路内を流動する微粒子の流動方向を操作する微粒子操作ユニットであって、前記流路中に、前記微粒子の少なくとも一部に対し透過を制限する透過制限領域が設けられ、前記透過制限領域の入口幅が前記透過制限領域の幅よりも狭く、前記透過制限領域内を流動する前記微粒子に、一の方向への移動速度を付与する第一の駆動手段および前記一の方向と異なる他の方向への移動速度を付与する第二の駆動手段を有し、前記透過制限領域に、離間して配置された複数の妨害体が設けられたことを特徴とする微粒子操作ユニットが

提供される。

本発明に係る微粒子操作ユニットにおいては、透過制限領域に、微粒子を互いに異なる複数の方向に移動させる第一の駆動手段および第二の駆動手段を有する。そして、流路に複数の妨害体が設けられている。このため、微
5 粒子の表面の性質や形状、大きさ、変形のしやすさ等に基づいて安定的に分離することができる。また、透過制限領域の入口幅が透過制限領域の幅よりも狭く構成されているため、微粒子を確実に分離することができる。

本発明において、前記微粒子は、高分子樹脂、金属、半導体、または生体分子のいずれかを含むものとすることができる。

10 本発明の微粒子操作ユニットにおいて、前記微粒子をその大きさに依存して分離する機能を有する構成とすることができる。

本発明の微粒子操作ユニットにおいて、前記流路に微粒子を懸濁した懸濁液が導入され、前記懸濁液を希釈する機能を有する構成とすることができる。

15 本発明の微粒子操作ユニットにおいて、前記流路に微粒子を懸濁した懸濁液が導入され、前記懸濁液を脱塩する機能を有する構成とすることができる。

本発明によれば、前記微粒子操作ユニットを有することを特徴とするチップが提供される。本発明に係るチップは、微粒子の流れを操作し、分離、濃縮、希釈、脱塩、溶媒置換等の機能を有する。たとえば、本発明に係るチップにおいて、微粒子操作ユニットが第一の流路および第一の流路から分岐する第二の流路を含む流路を有し、第一の流路から一以上の前記第二の流路が分岐する分岐点の近傍の第一の流路中に、微粒子の少なくとも一部に対し透過を制限する透過制限領域を備えた構成とすることができる。

20 25 このような構成である場合、第一の流路中の微粒子は、透過制限領域を経由して、第一の流路および第二の流路に分離され、これをもって微粒子の流動方向が操作されている。このような構成の微粒子操作ユニットを有するチップにおいて、透過制限領域よりも上流側に、第一の流路と連通する試料導入部を有してもよい。また、他の流路から微粒子を含む試料を導入することも可能である。一方、透過制限領域よりも上流側には、第一の流路または第

二の流路と連通する試料排出部を有していてもよいし、試料回収部を有していてもよい。

また本発明によれば、このチップと、前記微粒子の検出手段とを備える検出装置が提供される。

- 5 この検出装置において、前記微粒子の検出手段が質量分析装置により構成されている構成とすることができる。

本発明によれば、それぞれ異なる分離手段を用いる二つ以上の工程を含むタンパク質の分離方法であって、タンパク質を分離する前記工程の一つに、少なくともタンパク質を連続的に分離する機能を有するチップを用いてタンパク質を分離する工程を含むことを特徴とするタンパク質の分離方法が提供される。

また、本発明によれば、タンパク質を粗分離する工程と、該工程の後、粗分離されたタンパク質を電気泳動により分離する工程と、を含み、タンパク質を粗分離する前記工程は、少なくともタンパク質を連続的に分離する機能を有するチップを用いてタンパク質を粗分離する工程を含むことを特徴とするタンパク質の分離方法が提供される。

本発明によれば、それぞれ異なる分離手段を用いる二つ以上の工程を含むタンパク質の分離方法であって、タンパク質を分離する前記工程の一つに、前記チップを用いてタンパク質を粗分離する工程を含むことを特徴とするタンパク質の分離方法が提供される。

また、本発明によれば、タンパク質を粗分離する工程と、該工程の後、粗分離されたタンパク質を電気泳動により分離する工程と、を含み、タンパク質を粗分離する前記工程は、前記チップを用いてタンパク質を粗分離する工程を含むことを特徴とするタンパク質の分離方法が提供される。

25 さらに、本発明によれば、前記タンパク質の分離方法によりタンパク質を分離した後、分離されたタンパク質をプロテアーゼ処理により分解し、さらにその分解生成物を質量分析装置により同定する工程を含むタンパク質の検出方法が提供される。

また本発明によれば、本発明のチップを用いてタンパク質を分離した後、複数のタンパク質を含む懸濁液から、親和性を利用して目的とするタンパク質を捕獲するタンパク質の捕獲方法が提供される。

さらに、このタンパク質の捕獲方法によりタンパク質を捕獲した後、前記
5 チップの表面を洗浄する工程を有し、さらに前記捕獲したタンパク質を質量分析装置により同定する工程を含むタンパク質の検出方法が提供される。

以上説明したように、本発明によれば、マイクロ流路内で液体中の微粒子の流れを操作する微粒子操作ユニット、それを搭載したチップと検出装置、およびタンパク質の分離、捕獲、検出方法が実現される。

10

図面の簡単な説明

上述した目的、およびその他の目的、特徴および利点は、以下に述べる好適な実施形態、およびそれに付随する以下の図面によってさらに明らかになる。

15 図 1 は、本実施形態に係る微粒子操作ユニットの構成の一例を示す斜視図である。

図 2 は、図 1 の微粒子操作ユニットの分岐点に設けられた妨害体と、分岐点の上流に存在する微粒子を示す上面図である。

20 図 3 は、本実施形態に係る微粒子操作ユニットの構成の一例を示す斜視図である。

図 4 は、図 3 の微粒子操作ユニットの分岐点に設けられた妨害体と、分岐点の上流に存在する微粒子を示す上面図である。

図 5 は、本実施形態に係る微粒子操作ユニットの構成の一例を示す斜視図である。

25 図 6 は、図 5 の微粒子操作ユニットに設けられた妨害体および微粒子を示す上面図である。

図 7 は、本実施形態に係る微粒子操作ユニットの構成の一例を示す上面図である。

図 8 は、本実施形態に係るタンパク質の分析手順を示す図である。

図 9 は、本実施形態に係るタンパク質の分析手順を示す図である。

図 10 は、本実施形態に係るチップの構成の一例を示す図である。

図 11 は、本実施形態に係る微粒子操作ユニットの分岐点に設けられた妨害体の構成を示す斜視図である。

図 12 は、本発明の実施例を説明する、タンパク質の分離状況の一例を示す模式図である。

図 13 は、実施例において二次元電気泳動により分離したタンパク質のスポットの様子を示す模式図である。

10 図 14 は、質量分析装置の構成を模式的に示す図である。

図 15 は、実施例のチップの概略構成を示す上面図である。

図 16 は、実施例のチップの分岐点の構成を示す図である。

図 17 は、実施例のチップの妨害体領域の構成を示す図である。

図 18 は、実施例のチップの妨害体領域の構成を示す図である。

15 図 19 は、実施例の微粒子操作ユニットに 100 bp の DNA を電気泳動した様子を示す図である。

図 20 は、実施例の微粒子操作ユニットに 300 bp の DNA を電気泳動した様子を示す図である。

20 図 21 は、本実施形態に係る微粒子操作ユニットの構成の一例を示す上面図である。

図 22 は、図 21 の微粒子操作ユニットの電極に印加する電圧を示す図である。

図 23 は、図 21 の微粒子操作ユニットの電極に印加する電圧を示す図である。

25 図 24 は、図 21 の微粒子操作ユニットの電極に印加する電圧を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施形態の例について図面を参照しながら説明する。なお、すべての図面において、同様な構成要素には同様の符号を付し、適宜説明を省略する。

(第一の実施形態)

- 5 本実施形態は、流路に形成された妨害体によって試料液体中に含まれる微粒子の流れを操作し、所定の方
- 10 向に導く微粒子操作ユニットに関する。図1は本実施形態に係る微粒子操作ユニットの構成の一例を示す斜視図である。図1に示されるように、基板41上に形成された流路1が分岐点43において流路2と流路3とに分岐する構成であり、流路1と流路2、および流路3
- 15 の分岐点には一定の間隙を設けて配列された複数の柱状構造の妨害体8からなる妨害部が設けられている。

- 20 まず、流路1の上流に微粒子4を含む懸濁液を充填する。微粒子4の大きさは、たとえばミリメートルオーダー以下とすることができる。また、たとえば、ミクロンオーダー以下とすることができる。この懸濁液は、流路1で
- 25 は矢印5の、流路2では矢印6の、流路3では矢印7の方向にそれぞれ流れる。この際、懸濁液を流すための外力の付与方法として、たとえば流路1の上流あるいは流路2と流路3の下流にポンプを設置することができる。また、毛細管現象を利用してよい。毛細管現象を利用すれば、ポンプ等の外力付与装置が不要となり、装置全体を小型、簡略化することができる。

- 30 またその他、懸濁液の流れを生じせしめる機構であればその種類に制限はない。この懸濁液の流れは微粒子4に作用し、微粒子4を流す力ともなる。また、液体を流すことなく、電気泳動や誘電泳動により微粒子4のみを泳動させてもよい。たとえば流路1、流路2および流路3にそれぞれ電極（不図示）を形成しておき、各電極間に電圧を印加すれば、微粒子4が電荷を有する
- 35 場合、電極に向かって効率よく誘導される。

図1の微粒子操作ユニットにおいて、分岐点43では、懸濁液中の成分のうち妨害体8の間隙を通過できる成分のみが流路2へと流れ、通過できない成分は流路3に流れる。図2は、分岐点に設けられた妨害体8と、分岐点4

3の上流に存在する微粒子4を示す上面図である。以下、微粒子4の流れる方向が妨害体によって操作される機構を、図2を用いて説明する。なお、本明細書において、粒子の変形のしやすさを考慮した粒径を、「実効的な粒径」と呼ぶ。

- 5 図2に示すように、複数の妨害体8間の間隙の幅 a が、溶媒中での変形のしやすさを考慮した微粒子4の実効的な粒径 b よりも狭い場合、微粒子4が間隙を通過しようとする際に受ける抵抗により、流路3の方向に微粒子4が通過する確率と比較して流路2の方向に通過する確率は小さくなる。また、この構造のうち隣接する妨害体8を結ぶ線分、たとえば線分9は微粒子4に
- 10 作用する力の方向10に対してある傾きを持って配置されている。すなわち角度11について、 $0^\circ < \text{角度}11 < 90^\circ$ が成り立つ。角度11が 0° の場合には、懸濁液全体が流路3のみに流れ、流路2に流れる成分がなくなってしまうからである。また、角度11が 90° の場合には、微粒子4が流路3に流れずに妨害体8の間隙に挟まって留まってしまい、妨害体8付近に堆
- 15 積してしまうからである。

なお、力の方向10は矢印5、6、および7で表される力の合力の方向を表している。微粒子4は液体中でブラウン運動しているため、 $0^\circ < \text{角度}11 < 90^\circ$ であれば妨害体8間の間隙に挟まって留まるのではなく、平均的には徐々に流路3の方向に流れていく。

- 20 たとえば、懸濁液として血液を考え、微粒子4として赤血球を考えた場合、複数の妨害体8間の間隙の幅 a を $3\mu\text{m}$ 程度とすることができる。こうすれば、懸濁液としての血液を、流路1の上流より毛細管現象を利用して流した場合に、分岐点43にて赤血球は血漿とともに流路3の方向に流れ、流路2には血漿のみ流れる。したがって、遠心分離装置を用いることなく血液から
- 25 血漿を分離できる。

この際、抽出用のバッファ等を用いないため、血漿の濃度が変化することはない。また、この場合、赤血球の破壊を防ぐためには、妨害体8から受ける抵抗をなるべく小さくすることが望ましいため、角度11をなるべく小さく

くすることが望ましい。また、赤血球にかかる力は毛細管現象による血液の流れる力にも関わるため、流路 2 と流路 3 の断面積の比を考慮することが望ましく、赤血球の破壊を防ぐためには流路 3 の断面積を相対的に大きくすることが望ましい。

- 5 このように、本実施形態では、液体で満たされた流路 1 において微粒子 4 を流しながらその流れを操作するユニットが構成される。また、この流れの操作においては、微粒子 4 を連続的に流すことが可能である。このため、比較的大量の試料を連続的に処理することが可能となる。

- また、従来、たとえば前述の非特許文献 1 に記載の方法に従ってタンパク
10 質のように 50 nm 以下の粒径を有する微粒子の流れを操作するためには、妨害体 8 の形状に求められる精度は高く、複雑な形状の妨害体を微細加工技術で作製するのは困難であった。これに対し、本実施形態によると、微粒子 4 の流れは複数の妨害体 8 の間の間隙によって制御され、妨害体 8 の形状にほとんど影響されない。このため、妨害体 8 の形状に求められる精度が微粒
15 子の粒径と比較してさらに小さなオーダーとなることはない。即ち、通常行われる微細加工で容易に作製可能な断面が円形の柱状構造を採用しても、微粒子 4 の流れを高い精度で制御することが可能となる。従って、本実施形態の微粒子操作ユニットは、微細な粒子に対応して容易に作製可能であり、連続的に微粒子 4 の流れの操作を行うことができる。

- 20 基板 41 の材料としては、シリコンを用いる。シリコン表面にはシリコン酸化膜を形成することが好ましい。このシリコン酸化膜により、基板 41 の表面が親水性を有することとなり、試料流路を好適に形成することが可能となる。なお、基板 41 の材料として石英等のガラスや、プラスチック材料等を用いてもよい。プラスチック材料として、たとえばシリコン樹脂、PMM
25 A（ポリメタクリル酸メチル）、PET（ポリエチレンテレフタレート）、PC（ポリカーボネート）等の熱可塑性樹脂や、エポキシ樹脂などの熱硬化性樹脂等が挙げられる。このような材料は成形加工が容易なため、製造コストを抑えることができる。さらに、基板 41 に金属を用いてもよい。

妨害体 8 は、たとえば、基板 4 1 を所定のパターン形状にエッチングすることにより形成することができるが、その作製方法には特に制限はない。

また、図 1 の妨害体 8 は円柱であるが、円柱、楕円柱等の擬円柱に限らず、円錐、楕円錐等の錐体；

5 三角柱、四角柱等の多角柱；

その他の断面形状を有する柱体；

等としてもよい。但し、微粒子の流れを高精度に制御するためには、錐体より柱体が好ましい。

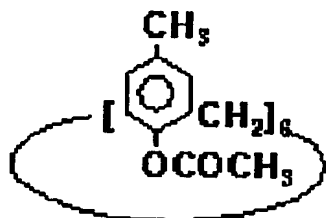
さらに、妨害体 8 にかわり、複数の開口部を有する板状の隔壁を形成してもよい。このとき、隔壁に形成する開口部の形状は、円形、楕円形、多角形、
10 の孔やスリット等、微粒子 4 の形状、大きさに応じて適宜選択される。

妨害体 8 のサイズは、たとえば、幅は $10\text{ nm} \sim 10\text{ }\mu\text{m}$ 程度とする。また、隣接する妨害体 8 の間隔は、微粒子 4 の形状、大きさに応じて適宜選択されるが、たとえば、 $5\text{ nm} \sim 10\text{ }\mu\text{m}$ とする。また、高さは図 1 では流路
15 1 の深さと同程度となっている。

また、基板 4 1 の表面に被覆を形成してもよい。被覆を設けることにより、流路 1、流路 2、および流路 3 中の試料液体の乾燥等が抑制される。被覆の材料としては、たとえば基板 4 1 と同様の材料の中から選択することができる。基板 4 1 と同種の材料を用いてもよいし、異なる材料としてもよい。

20 次に、図 1 の微粒子操作ユニットの製造方法について説明する。基板 4 1 上への流路 1、流路 2、および流路 3、および妨害体 8 の形成は、基板 4 1 を所定のパターン形状にエッチング等を行うことによってできるが、その作製方法には特に制限はない。

たとえば、微細加工用レジストのカリックスアレーンを用いた電子線露光
25 技術を利用して作製することが可能である。カリックスアレーンの分子構造の一例を以下に示す。カリックスアレーンは電子線露光用のネガレジストとして用いられ、ナノメートルスケールの微細加工用のレジストとして好適に利用することができる。



ここでは、基板 4 1 として面方位が (1 0 0) のシリコン基板を用いる。まず、基板 4 1 上にシリコン酸化膜、カリックスアレーン電子ビームネガレジスト膜をこの順で形成する。シリコン酸化膜、カリックスアレーン電子線
5 露光用ネガレジスト膜の膜厚は、それぞれ 4 0 n m、5 5 n m とする。次に、電子線露光装置を用い、妨害体 8 となる領域を電子線露光する。現像はキシレンを用いて行い、イソプロピルアルコールによりリンスする。この工程により、カリックスアレーン電子線露光用ネガレジストがパターンニングされる。

つづいて全面にポジフォトレジストを塗布する。膜厚は 1 . 8 μ m とする。
10 この際、電子線露光され、現像工程を経て残ったカリックスアレーンレジストはポジフォトレジストの溶媒に溶解しない。その後、流路 1、流路 2、および流路 3 となる領域が露光するようにマスク露光をし、現像を行う。この工程により、カリックスアレーンとポジフォトレジストによるレジストマスクが形成される。

次に、レジストマスクを用いてシリコン酸化膜を C F₄、C H F₃ の混合ガスを用いてドライエッチング除去する。残ったポジフォトレジストをアセトン、アルコール、水の混合液を用いた有機洗浄により除去した後、更に残ったポジフォトレジストとカリックスアレーンレジストを酸化プラズマ処理により除去する。つづいて、レジストパターンを転写したシリコン酸化膜を
20 マスクとして、シリコン基板を H B r ガスにより 2 μ m ドライエッチングする。つづいてバッファードフッ酸水溶液でウェットエッチングを行い、シリコン酸化膜を除去する。以上により、基板 4 1 上に流路 1、流路 2、および流路 3、および妨害体 8 が形成される。

ここで、以上の工程に次いで、基板 4 1 表面の親水化を行うことが好まし

い。基板 4 1 表面を親水化することにより、流路 1、流路 2、および流路 3 や妨害体 8 に試料液体が円滑に導入される。特に、妨害体 8 により流路が微細化した分岐点 4 3 においては各流路の表面を親水化することにより、試料液体の毛細管現象による導入が促進され、流れの操作精度が向上する。

- 5 そこで、たとえばエッチング工程の後、基板 4 1 を酸化炉に入れてシリコン熱酸化膜を形成する。このとき、たとえばシリコン熱酸化膜の膜厚が 30 nm となるように熱処理条件を選択する。またこの場合には、予めこの酸化膜厚を考慮して妨害体 8 の配列を設計する。シリコン熱酸化膜を形成することにより、分離装置内に液体を導入する際の困難を解消することができる。
- 10 その後、被覆を設ける場合は静電接合を行い、シーリングして微粒子操作ユニットを完成する。

また、基板 4 1 にプラスチック材料を用いる場合、エッチングやエンボス成形等の金型を用いたプレス成形、射出成形、光硬化による形成等、基板 4 1 の材料の種類に適した公知の方法で行うことができる。

- 15 基板 4 1 にプラスチック材料を用いる場合にも、基板 4 1 表面の親水化を行うことが好ましい。基板 4 1 の表面を親水化することにより、流路や妨害体 8 の形成された領域に試料液体が円滑に導入される。特に、妨害体 8 により流路が微細化した分岐点 4 3 においては、基板 4 1 の表面を親水化することにより、試料液体の毛細管現象による液体の導入が促進されるため好ましい。
- 20 い。

- 親水性を付与するための表面処理としては、たとえば、親水基をもつカップリング剤を流路の側壁に塗布することができる。親水基をもつカップリング剤としては、たとえばアミノ基を有するシランカップリング剤が挙げられ、具体的には N- β (アミノエチル) γ -アミノプロピルメチルジメトキシシラン、N- β (アミノエチル) γ -アミノプロピルトリメトキシシラン、N- β (アミノエチル) γ -アミノプロピルトリエトキシシラン、 γ -アミノプロピルトリメトキシシラン、 γ -アミノプロピルトリエトキシシラン、N-フェニル- γ -アミノプロピルトリメトキシシラン等が例示される。これ
- 25

らのカップリング剤は、スピンコート法、スプレー法、ディップ法、気相法等により塗布することができる。

なお、図 1 の微粒子操作ユニットでは、流路 1 と流路 2 とを含む第一の流路と、分岐点 4 3 において第一の流路から分離する流路 3、すなわち第二の流路とを有する構成とした。図 1 では、流路 1 と流路 2 との形成方向は一致しており、流路 1 および流路 2 に対し、流路 3 は所定の角度をもっているが、流路 1 と流路 2 とが所定の角度をなしていてもよい。

(第二の実施形態)

本実施形態は、流路に形成された妨害体によって試料液体中に含まれる微粒子の流れを操作し、所定の方向に導く微粒子操作ユニットに関する。第一の実施形態と異なる点は、複数段の妨害部が形成された領域を有する点である。図 3 は本実施形態に係る微粒子操作ユニットの構成の一例を示す斜視図である。

図 4 は、分岐点 4 3 に設けられた妨害体 8 と、分岐点 4 3 の上流に存在する微粒子 4 を示す上面図である。以下図 4 を用いて、微粒子 4 の流れる方向が妨害体によって操作される機構を説明する。図 4 に示されるように、複数段になった妨害体 8 の配列構造は、一点鎖線で示した単位胞 1 2 を形成している。この単位胞 1 2 中の間隙の幅においては、図 4 に示したとおり、試料液体中での変形のしやすさを考慮した微粒子 4 の実効的な粒径 b と比較して間隙の幅 a は小さく、幅 c は大きく設定されている。すなわち $a < b < c$ である。従って、粒子 4 は方向 1 0 の方向に合力を受けて流れていこうとするが、間隙の幅 a が小さいため、幅 a を横切る方向に妨害体 8 の配列を移動できる確率は低く、ブラウン運動により妨害体 8 と衝突を繰り返しながら、その多くは流路 3 の方向に流れていくことになる。

本実施形態の場合、妨害体 8 の配列構造が合力の方向 1 0 に対して複数段設けられている部分がある。微粒子 4 が DNA やタンパク質のような生体高分子等、ある程度変形する粒子の場合には、このように複数段の配列構造を設けることにより、幅 a を横切る方向に妨害体 8 の配列中を移動する確率を

更に低くすることができる。但し、本実施形態の微粒子操作ユニットによって流れを操作される微粒子は、生体分子に限られるわけではなく、たとえば抗体を付着させたポリスチレンビーズや金微粒子、あるいは半導体量子ドットのように高分子樹脂、金属、または半導体であっても適用でき、連続的に
5 微粒子の流れの操作を行うことができる。

また、本実施形態で操作する試料液体には、図に示されるように、試料が微粒子4の他に更に小さい微粒子13を含んでいてもよい。試料液体中での微粒子13の実効的な粒径 d は妨害体8間の間隙の幅 a より小さい。すなわち、 $d < a < b < c$ である。従って、微粒子13については、幅 a を横切る
10 方向に妨害体8の配列中を移動できる確率は十分大きい。即ち、微粒子4と微粒子13を含む懸濁液を試料液体として流路1の上流から流すことにより、流路2では微粒子4を含まない液体を取り出すことができる。

このため、本実施形態に係る微粒子操作ユニットは、微粒子4および13をその大きさに依存して平面的に分離する機能を有している。なお、本実施
15 形態では流路3にも微粒子13が流れ込むが、微粒子を流す力を加減すると共に流路の分岐点の構造を工夫することにより、流路3に流れ込む微粒子13の量を十分少なく抑えることも可能である。

図11は、本実施形態に係る微粒子操作ユニットの分岐点に設けられた妨害体の構成を示す斜視図である。図11の微粒子操作ユニットについては後
20 述するが、この構成では流路2および流路3の交差部の流路壁の角部を除去し、流路拡張部45を形成している。そして、流路拡張部45にも妨害体8を形成することにより、妨害体8の配列の長さを増すことが可能となるため、より一層精度、効率よく微粒子の流れを操作することができる。

なお、本実施形態に係る微粒子操作ユニットに用いる材料および製造方法
25 は、たとえば第一の実施形態に記載の材料、方法を用いることができる。本実施形態の微粒子操作ユニットは、妨害体8が複数段形成されているが、妨害体の形状自体は微細加工技術を用いて容易に作製することが可能であり、微粒子の流れをさらに精度良く制御することが可能な構成である。

(第三の実施形態)

本実施形態は、流路内の壁面に所定の大きさの微粒子と相互作用可能なトレンチ構造を単位胞とする妨害体の配列構造の形成された、微粒子の流れを操作するユニットに関する。図5は本実施形態に係る微粒子操作ユニットの一例を示す斜視図である。図5に示す通り、基板47上に流路14が形成されている。流路14の上流には微粒子15を懸濁させた試料液体が充填される。この微粒子15は図5中に示した矢印16の方向に流れる。第一の実施形態と同様に微粒子15を矢印16の方向に流す力は電気泳動や誘電泳動等の方法で生じさせても良いし、微粒子15に作用する力であればこれらに限らない。

図5に示した通り、流路14内には、トレンチ構造17を単位胞とする配列構造が流路底面に形成されている。なお本実施形態では流路14の底面にトレンチ構造17が形成されているが、流路14における他の壁面でもかまわない。トレンチ構造17からなる配列構造の一部分を上面図で示したのが図6である。図6に示されるように、一点鎖線18で囲まれたトレンチ構造17からなる単位胞により配列構造が形成されている。この配列構造中にはトレンチ構造17aとその鏡映対称になるトレンチ構造17bの2種類の配列構造を、一点鎖線19を境界にして含んでいる。

このようなトレンチ構造は半導体微細加工技術やMEMS技術で作製できる。また、たとえばタンパク質のように50nm以下の粒径の微粒子の流れを操作する場合には、自己組織的に形成できる多孔性材料を用いて形成することもできる。多孔性材料としてはシリカやジルコニア等のメソポーラス構造が良く知られており、有機高分子膜をテンプレートにすることにより、配列構造を形成できる。また、陽極酸化アルミナは自己組織的にトレンチ構造の配列構造をアルミ膜の陽極酸化により形成するが、さらに、ナノインプリント法等を用いて陽極酸化前にアルミ膜に核形成点となる傷を予め作製し、その後陽極酸化することにより、図6に示したような規則構造を作製することが可能である。

なお、図 5 の微粒子操作ユニットでは、流路 14 の底面に設けられたトレンチ構造 17 の径と単位胞の周期が共に二次元平面的に方向により異なるが、どちらか一方のみでも良い。また、図 5 においてはトレンチ構造 17 が楕円形の場合を例示しているが、楕円形に限定されるものではない。流路 14 底面に設けられた楕円形をした孔の長径 e と短径 f は微粒子 15 と十分相互作用するために微粒子 15 の粒径 g に近いことが望ましい。楕円形のようにトレンチ構造 17 の径が二次元平面上で異なる場合にはその差異により微粒子 15 との相互作用に対しても二次元平面的な差異が生じる。またトレンチ構造 17 の周期が二次元平面上で異なる場合には微粒子 15 が流れる間にトレンチ構造 17 から相互作用を受ける頻度が二次元的に方向によって異なってくる。

以上のように、妨害体をトレンチ構造 17 とした場合にも、微粒子 15 の流れを操作する微粒子操作ユニットを実現できる。このとき、トレンチ構造 17 が微粒子 15 の流れに対する抵抗となり、抵抗の大きさは微粒子 15 の大きさに依存する。このため、トレンチ構造 17 と微粒子 15 との相互作用の程度は微粒子 15 の形状、大きさによって異なることを利用して、試料中の特定の微粒子について分離、濃縮等の処理を施すことが可能となる。

なお、この微粒子 15 の操作の原因となる相互作用は第一または第二の実施形態のように柱状の妨害体の配列による相互作用より一般的に弱いため、微粒子 15 の流れる方向に沿って複数段設けることが望ましい。また、図 5 においては、微粒子 15 の流れを形成する力の矢印 16 に対してトレンチ構造 17 の長軸方向と短軸方向が平行でも垂直でも無い配列構造を取っている。これにより、効果的に流路 14 内において微粒子 15 の流れを図中の左右方向に操作することができる。

本実施形態の場合には、さらに配列構造に鏡映対称性を持たせていることにより、微粒子 15 が流れるうちにその境界を示している一点鎖線 19 近傍に集まってくる。このため、微粒子 15 の濃縮効果を有する。なお、本実施形態においては、一点鎖線 19 と矢印 16 が平行になっているが、平行でな

いトレンチ構造を形成することもできる。またトレンチ構造 17 の配列は鏡映対称な配列には限定されず、流路 14 の分岐の有無等の構成に対応して所望の配列を選択することが可能である。

また、本実施形態に係る微粒子操作ユニットの下流側に、直進する流路と、
5 当該流路に分岐する流路とを設けておけば、たとえば一種の微粒子が分散する分散液を流した際に、直進する流路には分離、濃縮された微粒子が流出し、分岐する流路には分散溶媒のみを回収することができる。

(第四の実施形態)

本実施形態に係る微粒子操作ユニットは、平面的に配列された妨害体を有
10 し、試料液体の希釈、脱塩、溶媒置換等を行うものである。図 7 は、本実施形態に係る微粒子の流れを操作する微粒子操作ユニットの構成を示す上面図である。図 7 の微粒子操作ユニットにおいては、基板（不図示）上に形成された流路 20 に流路 21 および流路 23 が接続しており、その接続点よりも下流側に、流路 22、流路 24、および流路 25 の 3 本の流路が分岐する
15 分岐点が生じている。そしてこの分岐点および分岐点の上流側に妨害体が形成されている。すなわち、図 7 では、流路の接続点近傍から分岐点近傍に至る領域に、妨害体が形成されている。

今、流路 20 を、微粒子 26 を含む試料懸濁液または緩衝液を分岐点に向かって流すための流路とする。また、流路 21 および流路 23 を、希釈用の
20 緩衝液または脱塩用の洗浄液、あるいは置換用の溶媒を分岐点に向かって注入するための流路とする。流路 22 と 24 は廃液を分岐点から抽出する流路である。流路 25 は微粒子 26 を含む希釈、脱塩、または置換された液体を抽出する流路である。分岐点への各流路の接続領域に示した矢印 27 ~ 32 は各流路の接続領域における液体の流れる方向を示している。分岐点となる
25 領域には間隙を挟んだ複数の柱状構造の妨害体 33 が鏡映対称性を持って図 7 に示した通り配置されている。

ここで、複数の妨害体 33 の間の間隙の幅 h 、 i および j は微粒子の粒径 k と比較して $j > h > k > i$ となっている。従って、微粒子 26 は幅 i を横

切る方向には妨害体 3 3 の配列を通過しにくく、幅 h と j を横切る方向には通過しやすい。その結果、微粒子 2 6 は流路 2 0 から流路 2 5 に選択的に導かれ通過し易く、流路 2 2 と流路 2 4 に流出しにくいため、流路 2 5 に選択的に排出されることになる。

5 一方、希釈用の緩衝液または脱塩用の洗浄液、あるいは置換用の溶媒は充分分子サイズが小さいため妨害体 3 3 の間の間隙の幅に依存せずに分岐点にて混合し、流路 2 2、流路 2 4、および流路 2 5 から排出される。従って図 7 の微粒子操作ユニットを用いることにより、液体を希釈する機能や、緩衝液を脱塩する機能、あるいは溶媒を置換する機能を実現できる。

10 本実施形態に係る微粒子操作ユニットに用いる材料および製造方法には、たとえば第一の実施形態に記載の材料、方法を用いることができる。

15 なお、以上の各実施形態に示した各々分離、濃縮、希釈、脱塩、溶媒置換等の機能を実現する微粒子操作ユニットは各々単独で使用することもできるし、組み合わせて使用することもできる。組み合わせて使用する場合には同一基板上に集積化することにより、安価に製造できる。また、同一基板上に集積化したチップ上で所望とする処理を連続的行えば、各ユニットを単独で使用する場合と比較してユニット間での試料の損失を抑制できる。

20 さらに、このようなチップを試料成分の分析装置、検出装置等に搭載し、微粒子処理システムを構成した場合にも、微粒子操作ユニットにおける上述の利点は有用である。このような微粒子処理システムとしては、たとえば微粒子がタンパク質である場合に、質量分析装置に連携させたタンパク質分析システム等の分析装置が一例として挙げられるが、この例に限定されことなく、種々の構成を採用することができる。

(第五の実施形態)

25 本実施形態は、試料中に含まれる特定のタンパク質を分離し、その同定を行うための微粒子処理システムに関する。図 8 は本実施形態に係るタンパク質の分析手順を示す図である。

ステップ 1 0 1 は、細胞や組織、あるいは生体標本等から分析するタンパ

ク質を抽出し、その抽出液を電気泳動に供するのに適した状態の試料に調製する試料調製工程を示している。

5 ステップ102は、第二の実施形態に記載の微粒子操作ユニットを有するチップを使用して、分析するタンパク質をその大きさに応じて分離するステップである。このようなチップとして、たとえば図10に示されるチップを用いることができる。図10に示されるチップについては、後に詳細に説明する。

10 ステップ103は、電気泳動によりタンパク質を分離するステップを示しており、たとえば等電点と分子量の違いによりタンパク質を分離する二次元電気泳動やその前処理としてのクロマトグラフィーによる分離もこのステップに含まれる。

ステップ104は、プロテアーゼ処理のステップを示しており、プロテアーゼによってタンパク質を加水分解することによりペプチドを含む分解生成物を得る。

15 ステップ105は、ステップ104で得た分解生成物を質量分析に供してペプチドの分子量を決定し、タンパク質の種類を同定するステップを示している。ステップ105には、質量分析に先立ち必要な脱塩等の前処理や、アミノ酸配列やアミノ酸組成等を決定する等の後処理のステップなども含まれる。

20 ここで、微粒子操作ユニットを用いた分離のステップ102を設けていない従来の方法の場合、以下のような課題を有していた。二次元電気泳動は極めて分離能が高いが、二次元電気泳動を行う際にゲルに投入できるタンパク質の総量には限界があった。しかし、タンパク質の発現量は種類によって一定ではないため、発現量の多いタンパク質があると、発現量の少ない微量タンパク質は二次元電気泳動後のスポットには極微量にしか含まれないこと
25 になる。この結果、タンパク質が微量であるためにスポットが判別できず、回収が困難であった。また、たとえスポットが判別できたとしても、タンパク質が微量であるため、質量分析の検出限界を下回り、検出不能になってし

まっていた。

これに対し、本実施形態ではステップ102において、電気泳動に先立ち分離を行う。このとき、第二の実施形態に記載の分離機能を有する図3の微粒子操作ユニットを使用して、発現量の多いタンパク質をその大きさに応じて分離除外する。このため、従来の方法についての上述の課題が解決され、発現量の少ないタンパク質の解析が可能となる。また、発現量の多いタンパク質に特に焦点を合わせて分離除外しなくても、タンパク質の大きさにより事前に粗く分離することにより、ゲルへの微量タンパク質の投入量を増加させることができるため、試料不足の問題を緩和することができる。このとき、図3の微粒子操作ユニットを用いれば連続的に分離を行うことができるため、二次元電気泳動の際にゲルに投入するタンパク質の量も容易に確保されるという利点がある。さらに微粒子操作ユニットはゲルを用いずに微細加工技術によって作製されているため、経時的な劣化が少なく、分離の再現性に優れているという利点も有する。

また、以上のように図10に示すチップによって分離した試料を二次元電気泳動により分離した後、さらにタンパク質のMALDI-TOFMS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometer:マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置) 用試料調製および測定を行うこともできる。

MALDI-TOFMS測定を行うためには、測定対象のタンパク質を、1000Da程度まで低分子化する必要があるため、ステップ104において低分子化を行った後、マトリックス溶液と混合し、乾燥試料とする。

まず、測定対象のタンパク質が分子内ジスルフィド結合を有する場合、DTT (ジチオスレイトール) 等の還元試薬を含むアセトニトリル等の溶媒中で還元反応を行う。この還元反応により、次の分解反応が効率よく進行する。なお、還元後、チオール基をアルキル化等により保護し、再び酸化するのを抑制することが好ましい。

次に、トリプシン等のプロテアーゼを用いて還元処理されたタンパク質分子の低分子化処理を行う。低分子化は燐酸バッファ等の緩衝液中で行われるため、反応後、脱塩および高分子画分すなわちトリプシンの除去を行う。そして、MALDI-TOFMSのマトリックスと混合する。

- 5 その後、濃縮、乾燥を行って、マトリックスと分解されたタンパク質の混合物を析出させる。乾燥後の試料をMALDI-TOFMS装置にセットして電圧を印加し、たとえば337nmの窒素レーザー光を照射し、ステップ105の質量分析を行う。

- 10 ここで、本実施形態で用いる質量分析装置について簡単に説明する。図14は、質量分析装置の構成を示す概略図である。図14において、試料台上に、以上の手順により得られた乾燥試料（不図示）が設置される。そして、真空下で乾燥試料に波長337nmの窒素レーザーが照射される。すると、乾燥試料はマトリックスとともに蒸発する。試料台は電極となっており、電圧を印加することにより、気化した試料は真空中を飛行し、リフレクター検知器、リフレクター、およびリニア検知器を含む検出部において検出される。

したがって、乾燥試料をMALDI-TOFMS装置の真空槽に設置しMALDI-TOFMSを行うことが可能である。

- 20 なお、MALDI-TOFMS用のマトリックスは、測定対象物質に応じて適宜選択されるが、たとえば、シナピン酸、 α -CHCA（ α -シアノー4-ヒドロキシ桂皮酸）、2,5-DHB（2,5-ジヒドロキシ安息香酸）、2,5-DHBおよびDHBs（5-メトキシサリチル酸）の混合物、HABA（2-（4-ヒドロキシフェニルアゾ）安息香酸）、3-HPA（3-ヒドロキシピコリン酸）、ジスラノール、THAP（2,4,6-トリヒドロキシアセトフェノン）、IAA（トランス-3-インドールアクリル酸）、
25 ピコリン酸、ニコチン酸等を用いることができる。

図10は本実施形態に用いるチップの構成を示す図である。図10のチップは、本実施形態においてタンパク質の検出に使用される5個の微粒子操作

ユニットを1枚の基板上に集積化したタンパク質の分離機能を有する。シリコン基板201上に流路202が形成され、その上に蓋203が接着されている。シリコン基板201への流路202および妨害体の形成においては、狭い間隙をシリコン基板201上に作製する必要があるため、電子線露光装置を使用してリソグラフィーを行う。そして、シリコン基板201をドライエッチングした後、熱酸化して円柱状の妨害体の径を増すことにより、間隙を狭めるという加工プロセスを採用することにより作製できる。但し、このような狭いギャップを作製する方法は上記の方法に限らず、たとえばガラス基板を加工した後にアルミ薄膜を成膜、酸化するといったような他の加工プロセスも採用できる。

また、本実施形態では微細加工の適用性に優れるシリコン基板201を用いたが、シリコンに限らず、高分子樹脂や金属、絶縁体の基板を用いてもよい。また、シリコン基板201と静電接合するため、本実施形態では蓋203の材料にガラスを使用した。接着方法は静電接合には限らず、蓋203の材料、ガラスだけでなく高分子樹脂や金属、絶縁体等が利用可能である。

蓋203上には7個の送液用パイプロ口204、205、206、207、208、209、および210が設置されており、各々蓋203を貫通して流路202に連通している。流路202には一点鎖線で囲まれた5個の分岐点211、212、213、214、および215が設けられている。

各々の分岐点は、図11に模式的に示す構造を取っている。即ち、流路内に複数段からなる円柱状の妨害体の配列が構成されており、タンパク質をその大きさに依存して平面的に分離する機能を有した微粒子操作ユニットとなっている。各種の大きさのタンパク質を含んだ懸濁液は送液用パイプロ口204から流路202に流し込まれ、分岐点211から分岐点215を通過して、送液用パイプロ口205から210に排出される。各分岐点の妨害体の配列は図11に示したように流路202の上流側では間隙の幅 n は広く、下流に行くに従って間隙の幅は m 、1と狭くなっていく。但し、間隙の幅 o は一定で十分広く取ってある。

このような設計により、流路 2 0 2 の上流より流れてくるタンパク質は分岐点に容易に侵入し、幅 1 よりサイズの大きいタンパク質は分岐点を幅 1 の間隙を抜けて通過できないため、ブラウン運動と妨害体との衝突等を繰り返しながら、平均的に斜め方向に伸びた流路に流れていく。一方、幅 1 よりサイズの小さいタンパク質は分岐点を幅 1 の間隙を抜けて通過できるため、直線状に流れてゆきやすい。さらに、斜めに延びた流路側に切れ込んで妨害体の配列が並んでおり、サイズの小さいタンパク質が妨害体の間隙を抜ける確率が高くなる様に流路構造が工夫されている。このような流路の構造で、さらに各パイプロの送液量を調整する事により十分な分離能でタンパク質をその大きさに従って分離できる。

なお、図 1 1 は模式図であるため 3 段の配列を描いているが、実際は 1 0 0 0 段程度の配列とすることが望ましい。また、間隙の幅も l 、 m 、 n の三種類より細かく分けて作製されていることが望ましい。間隙の幅のうち、 n 、 m 、 l は各分岐点 2 1 1 から 2 1 5 で各々異なり、2 1 1 から 2 1 5 になるにつれて広がっていくようにする。ただし、 n 、 m 、 l の大小関係は各分岐点で変わらない。本実施形態では、たとえば分岐点 2 1 1 の間隙の幅 l として 1 0 . 0 nm、分岐点 2 1 2 の間隙の幅 l として 1 2 . 5 nm、分岐点 2 1 3 の間隙の幅 l として 1 5 . 0 nm、分岐点 2 1 4 の間隙の幅 l として 1 7 . 5 nm、分岐点 2 1 5 の間隙の幅 l として 2 0 . 0 nm と設計することができる。

微粒子操作ユニットをこのような構成とすることにより、ほぼ 1 0 k D a から 1 0 0 k D a のタンパク質をその大きさに従って分離することができる。最も小さなタンパク質は分岐点 2 1 1 にて分離されパイプロ 2 0 6 から排出される。さらにパイプロ 2 0 7、2 0 8、2 0 9、2 1 0 と順々により大きなタンパク質が排出される。図 1 2 はこの様子を描いた模式図である。図 1 2 において、分岐点 2 1 1 で分離され、パイプロ 2 0 6 にて排出されるタンパク質は、たとえばタンパク質の大きさと通過確率で囲まれる領域 2 1 6 で示される。さらにパイプロ 2 0 7、2 0 8、2 0 9、2 1 0 から排出さ

れるタンパク質は、各々領域 2 1 7、2 1 8、2 1 9、2 2 0 で示される。

以上のチップによる粗精製ステップをゲルによる二次元電気泳動の前処理として挿入すると、ゲル上の分離したタンパク質のスポットにおいて、その中のタンパク質の濃度を増加させることができる。図 1 3 は二次元電気泳動により分離したタンパク質のスポットの様子を示す模式図である。図 1 3

(a) は従来の前処理として粗精製ステップを行わない場合を示しており、図 1 3 (b) は前処理として粗精製ステップを行った場合を示している。図 1 3 (a) に示されるように、横軸は等電点による分離を示しており、縦軸は分子量による分離を示している。分離されたタンパク質のスポットは、たとえば図 1 3 (a) 中のスポット 2 2 1 a の様に二次元マップ上に現れる。

二次元電気泳動においては、一回の分離においてゲルに投入できるタンパク質の総量は 1 0 0 μ g 程度に限られているため、通常スポットに含まれるタンパク質の濃度には限界がある。しかしながら、二次元電気泳動の前処理として図 1 0 のチップを使用して粗精製を行うと、図 1 2 のように分子量と相関のあるタンパク質の大きさに従って、タンパク質試料を 5 分割できる。従って、分割したタンパク質試料を各々 1 0 0 μ g ずつ 5 枚のゲルに投入することにより、図 1 3 (b) の様にタンパク質のスポットを有する 5 枚のゲルが得られる。これらのスポットは一点鎖線で示した領域 2 2 2 から 2 2 6 に各々集中して現れる。図 1 3 (a) の従来の場合と比較して、これらのスポットは各々ほぼ 5 倍の量のタンパク質を含む。従って、たとえばスポット 2 2 1 a から収集できるタンパク質の量があまりに微量であるために、質量分析装置の検出感度を下回っていた場合においても、スポット 2 2 1 b の場合には質量分析装置で検出することが可能となる場合がある。

以上、図 1 0 のチップを用いて分離した試料を用いた場合を例に説明をしたが、その他の実施形態に記載の微粒子操作ユニットを含むチップを用いることももちろん可能である。

また、以上においてはステップ 1 0 5 においてタンパク質の質量分析を行う場合を例に説明したが、シーケンサーなどを用いた分析等を行う場合に

も、本実施形態に係る微粒子操作ユニットによる前処理が適用可能である。また、本実施形態において使用する微粒子操作ユニットは、第二の実施形態に記載の構成に限定されるものではなく、その他の態様とすることも可能である。

5 (第六の実施形態)

本実施形態は、試料中に含まれる特定のタンパク質を分離し、その同定を行うための微粒子処理システムの別の一例に関する。図9は本実施形態に係るタンパク質の分析手順を示す図である。

10 図9において、ステップ106は細胞や組織、あるいは生体標本等から分析対象となるタンパク質を抽出し、その抽出液をプロテインチップにより精製するのに適した状態の試料に調製する試料調製ステップを示している。

ステップ107は、第二の実施形態に記載の図3の微粒子操作ユニットを使用して、分析するタンパク質をその大きさに応じて分離するステップである。

15 ステップ108は、ステップ107で粗精製され、分離されたタンパク質をプロテインチップ上に添加し、チップ上に固定化された被吸着物質に親和性のあるタンパク質のみを分離するステップを示している。

20 ステップ109は、洗浄ステップを示しており、プロテインチップ上に残留している塩等の不純物や親和性を有しない物質を水や緩衝液により洗い流して除去するステップである。

ステップ110は、ステップ109を経てプロテインチップ上に残留した親和性のあるタンパク質を質量分析に供して分子量を決定し、タンパク質の種類を同定するステップを示している。

25 ここで、粗精製のステップ107でスピンカラムを使用していた従来の方法の場合、以下のような問題点を有していた。プロテインチップは比較的分子量の小さい25KDa以下のタンパク質の感度が高い。このため、前処理としてスピンカラムによる粗精製が行われていた。ところが、粗精製にスピンカラムを使用した場合、精製後のタンパク質の量がプロテインチップに投

入するのに不足していた場合には、再度スピнкаラムによる粗精製を行わなければならない。従って、処理操作が煩雑であり、自動化等にも支障をきたしていた。

これに対し本実施形態では、粗精製のステップ 107 において図 3 の微粒子操作ユニットを使用することにより、スピнкаラムで間欠的にしか行うことができなかった粗精製ステップを連続的に行っている。従って、プロテインチップに必要とするタンパク質の量に達するまで目的のタンパク質を連続的に収集できる。このため、ステップの自動化にも好適である。また、この微粒子操作ユニットはチップ上に搭載できるため、プロテインチップと同一のチップ上に集積化することもできる。この場合には、操作する人間の手間が省けるだけでなく、ステップ 107 からステップ 108 の間の試料の損失を最小限に抑えることができる。従って、タンパク質の検出方法全体としても、高感度化を実現できるという産業上の利点を有する。

(第七の実施形態)

本実施形態は、電界と流路に形成された妨害体により試料液体中に含まれる荷電微粒子の流れを操作し、荷電微粒子の大きさに従って所定の方

向に導く微粒子操作ユニットに関する。図 21 は本実施形態に係る微粒子操作ユニットの構成の一例を示す上面図である。図 21 において、妨害体 101 を含む流路構造が基板 103 上に作製されている。x 軸は流路 102 の延在方向に平行であり、y 軸は x 軸に垂直な方向である。

図 21 において、図中 x 軸方向に平行な妨害体 101 の列が設けられており、その列を y 軸方向に一定の間隔で複数段設けた構成となっている。また、妨害体 101 は、断面が円形の柱状構造をしている。また、妨害体 101 は、流路 102 内で図に示すとおり横（図中 x 軸）方向と縦（図中 y 軸）方向とで間隙の幅が異なるように配置されている。

なお、本実施形態では、妨害体 101 の断面形状として円形を選択しているが、これはリソグラフィーの容易さを考慮したものであり、四角形等の他の断面形状であってもよい。また、妨害体は、所定の間隔の列等のマトリッ

クス状に配置されていることが好ましい。こうすれば、微粒子をさらに安定的に分離することができる。

また、本実施形態の微粒子操作ユニットは、挿入口104の上流側に設けられた電極110と、挿入口104の下流側に、流路102の延在方向に沿って設けられた電極106および流路102を横切るように電極106より下流に設けられた電極105とを有する。図21では、電極105と電極106とが直交する向きに設けられている。電極105は、流路102の下流側の端部の流路壁に沿って、図中のx軸方向に設けられ、電極106は、流路102の側壁に沿って、図中のy軸方向に設けられている。また、電極106に対向する側の流路壁近傍に、試料を導入する挿入口104が設けられている。流路102において、挿入口104の幅は、その下流に設けられた微粒子の流動を操作する領域よりも狭い構成となっている。

この流路に挿入口104からDNAやSDS処理したタンパク質のような荷電微粒子を導入し、電気泳動させる。その際、挿入口104のさらに上流にある電極110と電極105と電極106に電圧を印加する。電圧条件としては、たとえば微粒子がDNAなどのように負に帯電している場合、図22に示したように、上流の電極110を負極として、電極105および電極106に正の電圧を印加する。さらに、電極105に印加する電圧は電極106に印加する電圧より大きくすることができる。こうすれば、微粒子の移動方向を大きさによって異ならせつつ、図中のy軸方向に優先的に移動させることができる。

また、図23および図24に示したように、パルス状の電圧を与え、さらに電極105にはパルスの印加時間や印加回数を電極106より長くしたり多くしたりすることもできる。図23では、電極105と電極106のパルスの周期を等しくし、パルス電圧の印加時間を電極105の方が大きくなるように設定した例である。また、図24は、電極105と電極106において、一度の印加のパルス幅を等しくし、印加回数を電極105の方が大きくなるように設定した例である。この場合にも、微粒子の移動方向を大きさ

によって異ならせつつ、図中の y 軸方向に優先的に移動させることができる。

図 2 1 にもどり、特に、電極 1 0 5 および電極 1 0 6 に直流電圧を印加する場合には、泳動した微粒子を誘導し、回収する隔壁 1 0 7 を設けることが望ましい。隔壁 1 0 7 は、一方向に沿って形成され、微粒子の回収部とすることができる。図 2 1 では、挿入口 1 0 4 から遠い側の流路 1 0 2 の側壁に、
5 複数の隔壁 1 0 7 が設けられている。隔壁 1 0 7 は、流路 1 0 2 の側壁から挿入口 1 0 4 の方向に向かう方向に設けられている。また、隔壁 1 0 7 は、流路 1 0 2 を区画して微粒子を分画できるように配置されていればよく、たとえば、x 軸方向に水平であってもよい。図 2 1 のように、上流側に角度を
10 有する隔壁 1 0 7 を流路 1 0 2 の延在方向に沿って複数配置することにより、異なる速度で移動した微粒子を、その大きさに応じて簡便に分取することができる。

このような条件で、小さい微粒子 1 0 8 と大きい微粒子 1 0 9 を含む試料を挿入口 1 0 4 から導入して電気泳動した場合、大きな微粒子や、硬い粒子
15 ほど妨害体 1 0 1 による抵抗を受ける。このため、y 軸方向の移動速度は、たとえば微粒子の粒径が小さいほど泳動速度が速く、粒径が大きいほど遅くなる。一方、妨害体 1 0 1 の間隙が x 軸方向には広いため、微粒子の粒径により y 軸方向のような速度差はつかないか、またはついても小さい。ただし、妨害体 1 0 1 を配置する際に、y 軸方向の間隙の幅は微粒子の粒径と同程度
20 にし、x 軸方向の間隙の幅は微粒子の粒径より大きくすることが望ましい。従って、小さい微粒子 1 0 8 と大きい微粒子 1 0 9 は電界と妨害体 1 0 1 の間隙を通過する際の抵抗により、図 2 1 に示したように、図中左上から右下に向かって斜めに泳動する。さらに、小さい微粒子 1 0 8 と大きい微粒子 1
0 9 の泳動方向は微粒子の大きさに従って異なり、大きい微粒子ほど、図中
25 の x 軸方向に近い方向に泳動する。

このように、図 2 1 の微粒子操作ユニットでは、流路 1 0 2 の一方の側壁近傍に設けられた挿入口 1 0 4 に導入された試料を、下流側に移動させつつ、他方の側壁側に移動させる。そして、流路 1 0 2 に多段に形成された柱状の

妨害体 101 により、微粒子の移動速度を微粒子の表面の性質や形状、大きさ、変形のしやすさ等によって異ならせる。このため、微粒子の大きさなどに応じて試料中の微粒子を分離し、流路 102 の延在方向に沿って当該他方の側壁に複数並んで配置された隔壁の間に回収することができる。

- 5 なお、本実施形態の微粒子操作ユニットは、試料中の微粒子に、異なる 2 方向に移動させる駆動力を付与する。このため、微粒子の移動は、妨害体 101 が設けられていない場合、これらの合力方向となる。そして、妨害体 101 の間隔、妨害体 101 の直径、微粒子の半径等によって微粒子の受ける抵抗が異なるため、この抵抗の違いによって、微粒子が受ける合力の方向が異なることとなる。このため、表面の性質や形状、大きさ、変形のしやすさ等によって安定的に分離することができる。そして、微粒子を流路 102 の所定の位置に一定方向に並んで設けられた隔壁 107 に微粒子を分離し、回収することができる。

- 15 実施形態に係る微粒子操作ユニットに用いる材料および製造方法は、たとえば第一の実施形態に記載の材料および方法を用いることができる。本実施形態の微粒子操作ユニットは、妨害体 101 が y 軸方向に複数段形成されているが、妨害体の形状自体は微細加工技術を用いて容易に作製することが可能であり、微粒子の流れをさらに精度良く制御することが可能な構成である。

- 20 なお、本実施形態では、DNA を例にとって説明したが、たとえばタンパク質を泳動した場合には、各々サイズの異なるタンパク質を電極 106 の各部に集め、その後電極 106 にレーザーをスキャンしながら照射することにより質量分析を行うこともできる。

- 25 また、図 21 の微粒子操作ユニットでは、一列をなす妨害体 101 が x 軸に平行な方向に配置されたが、妨害体 101 の列が、x 軸に対して所定の角度を有して配置されてもよい。また、妨害体の配置は、図 21 に示した列状の配置には限定されず、後述する微粒子の移動速度や、挿入口 104 や隔壁 107 を設ける位置に応じて適宜選択することができる。たとえば、図 21 においては、妨害体 101 の x 軸方向の間隔が、どの列についても一定であ

る構成としたが、妨害体 101 の x 軸方向の間隔が、y 軸方向に上流から下流へ向かうに従って狭くなる構成としてもよい。こうすることにより、分離する微粒子の大きさの範囲をさらに拡張することができる。

また、図 21 では、電極 104、電極 105、および電極 110 を用い、
5 異なる方向に電圧を印加することにより微粒子を移動させているが、ポンプ等を用いて、微粒子を圧送することにより移動させてもよい。また、図 21 では、2 方向に電位を生じさせる構成としているが、微粒子を移動させる駆動力を付与する方向は 2 方向に限らず、3 方向以上とすることもできる。

以上、本発明を実施形態に基づき説明した。本発明は上記の実施形態に限定されず、本発明の技術思想の範囲内において、適宜変更され得ることは明らかである。すなわち、これらの実施形態は例示であり、各構成要素や各製造工程の組合せにいろいろな変形例が可能なこと、またそうした変形例も本発明の範囲にあることは当業者に理解されるところである。

たとえば、以上の実施形態において、微粒子の移動を妨害する妨害部として、柱状体にかえて、流路の表面に疎水性領域を形成し、疎水性領域を除く表面を親水性領域としてもよい。こうすれば、分子サイズが大きい程、疎水性領域が障害となり、移動に要する時間が長くなる。疎水性領域は、疎水基を有するカップリング剤を基板の表面に付着ないし結合することにより形成することができる。

20 以下、本発明を実施例によりさらに説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

(実施例)

本実施例では、図 11 を用いて前述した微粒子操作ユニットの分岐流路の方向が左右逆転した構成の微粒子操作ユニットをチップ上に作製し、評価した。図 15 は、本実施例に係るチップの概略構成を示す上面図である。チップ 245 では、基板 231 上に、流路 233 および流路 235 からなる主流路と、流路 237 が形成されている。流路 233、流路 235、および流路 237 のそれぞれに、液溜め 239、液溜め 241、および液溜め 243 が

連通している。また、流路 2 3 3、流路 2 3 5、および流路 2 3 7 は図中に点線で示される分岐点 2 4 7 にて連通している。また、液溜め 2 3 9、液溜め 2 4 1、および液溜め 2 4 3 は、それぞれ白金線（不図示）の挿入により形成された電極（不図示）を有する。

- 5 本実施例において、微粒子操作ユニットの作製には、第五の実施形態に記述した加工方法を用いた。図 1 6 は、作製した微粒子操作ユニットの分岐点 2 4 7 を示す顕微鏡像を示す図である。分岐流路の方向が左右逆転しているが、図 1 1 に模式的に示した微粒子操作ユニットに対応する構成となっていることがわかる。なお、図 1 6 において、流路 2 3 3 および流路 2 3 5 の流路幅は 4 0 μm とした。また、図中の妨害体領域に、妨害体の配列を 1 0 0 0 段程度形成した。

- 図 1 7 は、妨害体領域の走査電子顕微鏡像を示す図である。図中の白い点の一つ一つが妨害体 8 である。妨害体 8 の間隙は分岐点下流側に向かって徐々に狭くなっている。さらに図 1 7 は分岐点の下流側であって、流路 2 3 7 に面した部分の走査電子顕微鏡像である。図 1 1 の 1 に当たる妨害体 8 の間の間隙は約 3 2 nm であり、n に相当する間隔は 1 5 0 nm である。一方、図 1 1 の o に相当する間隔は約 1 5 0 nm である。図 1 8 は、妨害体領域に形成された妨害体 8 の配列構造を拡大した電子顕微鏡像を示す図である。

- 本実施例では、微粒子操作ユニットを用いることにより、以下に記載する DNA の操作を行った。

バッファ液を満たした流路中で、蛍光染色した DNA を電気泳動し、観察した。電気泳動の際には、流路 2 3 3 に - 5 V、流路 2 3 5 に 1 8 V、流路 2 3 7 に 1 . 5 V の電圧をそれぞれ印加した。

- 図 1 9 は、図 1 6 と同一位置で観察した、1 0 0 b p の DNA を電気泳動した場合の蛍光顕微鏡像を示す図である。図 1 9 において、白い一点一点が各々蛍光染色された DNA に相当する。ほとんどの DNA は流路 2 3 7 には泳動せず、多くは約 3 2 nm の間隙を通過して流路 2 3 5 に流れている。なお、P. G. R i g h e t t i 著、「C a p i l l a r y E l e c t r o

phoresis in Analytical Biotechnology], 1996 CRC Press, Inc., p. 480によると、DNAの慣性半径は、下記式(1)によって算出される。

$$\langle r^2 \rangle = \frac{1}{12} b^2 \left(\frac{2N}{330} - 1 + e^{\frac{-2N}{330}} \right) \quad (1)$$

- 5 (ただし、上記式(1)において、 r は慣性半径であり、 b はKuhn長であり、100 nmである。また、 N はDNAの塩基対の数である。)

上記式(1)を用いて算出した慣性半径を用いると、100 bpのDNAの慣性半径から算出した粒径は約22 nmであり、本実施例の印加電圧条件下におけるバッファ液中での変形のしやすさを考慮したDNAの粒径はさら
10 らに小さくなるため、約32 nmの間隙を通過している。

また、図20は、300 bpのDNAを同じ印加電圧の条件で電気泳動した場合の蛍光顕微鏡像を示す図である。DNAは約32 nmの間隙を通ることなく流路237に流れている。なお、300 bpのDNAの慣性半径から算出した粒径は、上記式(1)より約57 nmであり、本実施例の印加電圧
15 条件下におけるDNAの変形のしやすさを考慮した粒径よりも十分大きく、約32 nmの間隙を通過することはできない。

以上示した通り、本実施例においては、DNAの大きさに従って流動方向を操作可能な微粒子操作ユニットが実現されている。なお、本実施例の微粒子操作ユニットを用いて、これらのDNAの分離を行うこともできた。

請 求 の 範 囲

1. 基板と、該基板上に形成された、第一の流路および該第一の流路から分岐する第二の流路を含む流路と、を備え、前記流路内の液体中を流動する
5 微粒子の流動方向を操作する微粒子操作ユニットであって、

前記第一の流路から一以上の前記第二の流路が分岐する分岐点の近傍の前記第一の流路中に、前記微粒子の少なくとも一部に対し透過を制限する透過制限領域を備えることを特徴とする微粒子操作ユニット。

2. 請求の範囲第1項に記載の微粒子操作ユニットにおいて、前記透過制限領域は、離間して配置された複数の妨害体を有することを特徴とする微粒子操作ユニット。
10

3. 請求の範囲第2項に記載の微粒子操作ユニットにおいて、隣接する前記妨害体間の間隙が、前記微粒子の一部を透過する大きさに設定されたことを特徴とする微粒子操作ユニット。

4. 請求の範囲第2項または第3項に記載の微粒子操作ユニットにおいて、前記微粒子の流動を形成する力の方向と、前記透過制限領域の前記分岐点側最前面における前記妨害体の配列方向とが、非直角または非平行となるように前記妨害体が配置されていることを特徴とする微粒子操作ユニット。
15

5. 請求の範囲第2項乃至第4項いずれかに記載の微粒子操作ユニットにおいて、複数の前記妨害体の配列により前記微粒子の流動方向を制御し前記微粒子の少なくとも一部を前記第一の流路または前記第二の流路のいずれかに導くことを特徴とする微粒子操作ユニット。
20

6. 請求の範囲第2項乃至第5項いずれかに記載の微粒子操作ユニットにおいて、前記妨害体が、平面的に周期的に配置されていることを特徴とする微粒子操作ユニット。
25

7. 基板と、該基板上に形成された、主流路および該主流路から前記主流路の下流側に向かって分岐する一以上の副流路を含む流路と、を備え、前記流路内を流動する微粒子の流動方向を操作する微粒子操作ユニットであっ

て、

前記主流路から一以上の前記副流路が分岐する分岐点の上流側に流動制御部を備え、

5 前記流動制御部は、前記微粒子の流動方向を制御し、前記微粒子の少なくとも一部を前記主流路または前記副流路のいずれかに導くことを特徴とする微粒子操作ユニット。

8. 請求の範囲第7項に記載の微粒子操作ユニットにおいて、前記流動制御部は複数の妨害体を有し、該複数の妨害体の配列により前記微粒子の流動方向を制御し前記微粒子の少なくとも一部を前記主流路または前記副流路
10 のいずれかに導くことを特徴とする微粒子操作ユニット。

9. 請求の範囲第7項または第8項に記載の微粒子操作ユニットにおいて、前記流動制御部は、周期的に配置された複数の前記妨害体を有することを特徴とする微粒子操作ユニット。

10. 請求の範囲第9項に記載の微粒子操作ユニットにおいて、前記流動
15 制御部における隣接する前記妨害体間の間隙が、前記主流路の形成方向と、前記副流路の形成方向とで異なることを特徴とする微粒子操作ユニット。

11. 基板と、該基板上に形成された流路と、を備え、前記流路内を流動する微粒子の流動状態を操作する微粒子操作ユニットであって、前記流路中に、トレンチが流路壁面に形成された流動制御部を有し、前記微粒子の少な
20 くとも一部を所定の方向に導くことを特徴とする微粒子操作ユニット。

12. 請求の範囲第11項に記載の微粒子操作ユニットにおいて、前記トレンチが前記流路壁面に周期的に形成された流動制御部を有することを特徴とする微粒子操作ユニット。

13. 請求の範囲第12項に記載の微粒子操作ユニットにおいて、前記流動制御部は、前記トレンチの開口形状または前記トレンチの間隔の異なる複数の周期パターンを含むことを特徴とする微粒子操作ユニット。
25

14. 請求の範囲第13項に記載の微粒子操作ユニットにおいて、前記複数の周期パターンは、前記流動制御部において鏡映対称に形成されているこ

とを特徴とする微粒子操作ユニット。

15. 基板と、該基板上に形成された流路と、を有し、前記流路内を流動する微粒子の流動方向を操作する微粒子操作ユニットであって、

前記流路中に、前記微粒子の少なくとも一部に対し透過を制限する透過制限領域が設けられ、

前記透過制限領域の入口幅が前記透過制限領域の幅よりも狭く、

前記透過制限領域内を流動する前記微粒子に、一方向への移動速度を付与する第一の駆動手段および前記一方向と異なる他の方向への移動速度を付与する第二の駆動手段を有し、

10. 前記透過制限領域に、離間して配置された複数の妨害体が設けられたことを特徴とする微粒子操作ユニット。

16. 請求の範囲第1項乃至第15項いずれかに記載の微粒子操作ユニットにおいて、前記微粒子が、高分子樹脂、金属、半導体、または生体分子のいずれかを含むことを特徴とする微粒子操作ユニット。

15. 17. 請求の範囲第1項乃至第16項いずれかに記載の微粒子操作ユニットにおいて、前記微粒子をその大きさに依存して分離する機能を有することを特徴とする微粒子操作ユニット。

18. 請求の範囲第1項乃至第17項いずれかに記載の微粒子操作ユニットにおいて、前記流路に微粒子を懸濁した懸濁液が導入され、前記懸濁液を希釈する機能を有することを特徴とする微粒子操作ユニット。

19. 請求の範囲第1項乃至第17項いずれかに記載の微粒子操作ユニットにおいて、前記流路に微粒子を懸濁した懸濁液が導入され、前記懸濁液を脱塩する機能を有することを特徴とする微粒子操作ユニット。

20. 請求の範囲第1項乃至第19項いずれかに記載の微粒子操作ユニットを有することを特徴とするチップ。

21. 請求の範囲第20項に記載のチップと、前記微粒子の検出手段とを備えることを特徴とする検出装置。

22. 請求の範囲第21項に記載の検出装置において、前記微粒子の検出

手段が質量分析装置により構成されていることを特徴とする検出装置。

23. それぞれ異なる分離手段を用いる二つ以上の工程を含むタンパク質の分離方法であって、

5 タンパク質を分離する前記工程の一つに、少なくともタンパク質を連続的に分離する機能を有するチップを用いてタンパク質を分離する工程を含むことを特徴とするタンパク質の分離方法。

24. それぞれ異なる分離手段を用いる二つ以上の工程を含むタンパク質の分離方法であって、

10 タンパク質を分離する前記工程の一つに、請求の範囲第20項に記載のチップを用いてタンパク質を粗分離する工程を含むことを特徴とするタンパク質の分離方法。

25. 請求の範囲第23項または第24項に記載のタンパク質の分離方法によりタンパク質を分離した後、分離されたタンパク質をプロテアーゼ処理により分解し、さらにその分解生成物を質量分析装置により同定する工程を
15 含むことを特徴とするタンパク質の検出方法。

26. 請求の範囲第20項に記載のチップを用いてタンパク質を分離した後、複数のタンパク質を含む懸濁液から、親和性を利用して目的とするタンパク質を捕獲することを特徴とするタンパク質の捕獲方法。

27. 請求の範囲第26項に記載のタンパク質の捕獲方法によりタンパク
20 質を捕獲した後、前記チップの表面を洗浄し、さらに前記捕獲したタンパク質を質量分析装置により同定する工程を含むことを特徴とするタンパク質の検出方法。

Fig.1

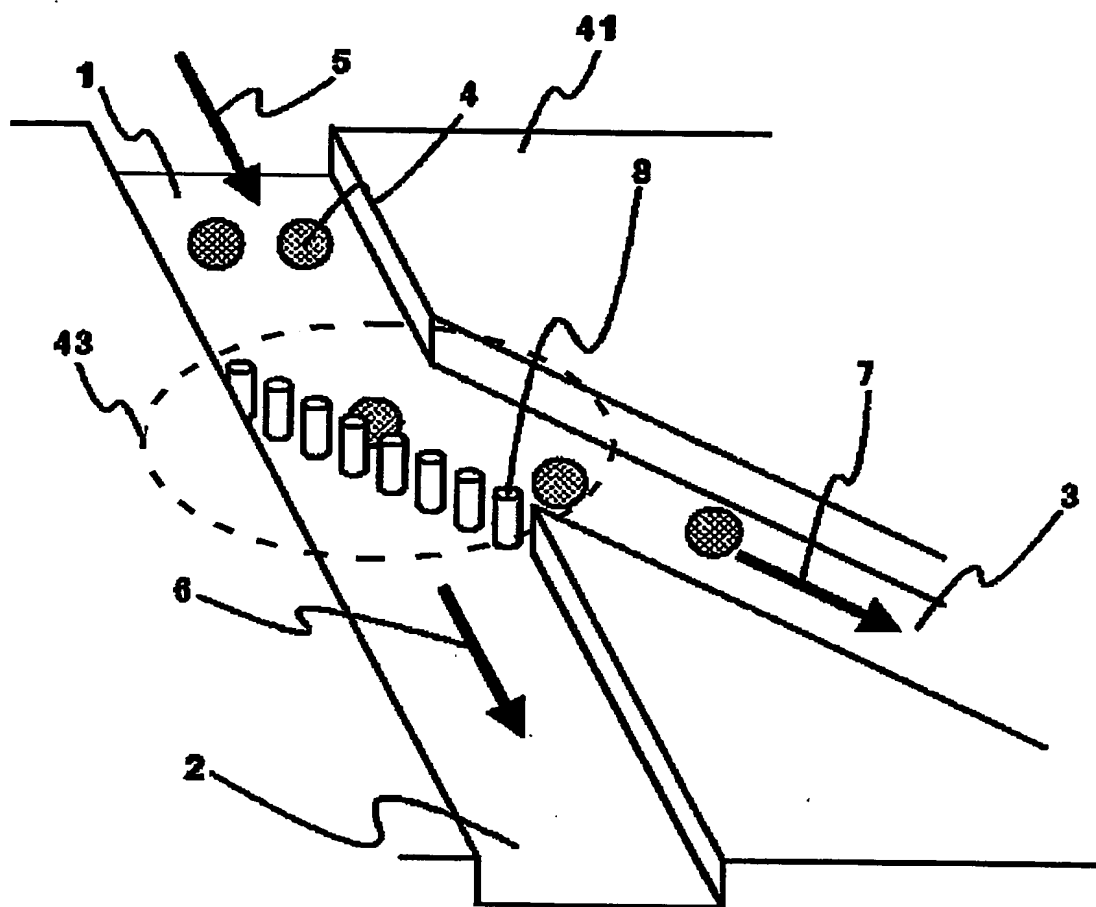


Fig.2

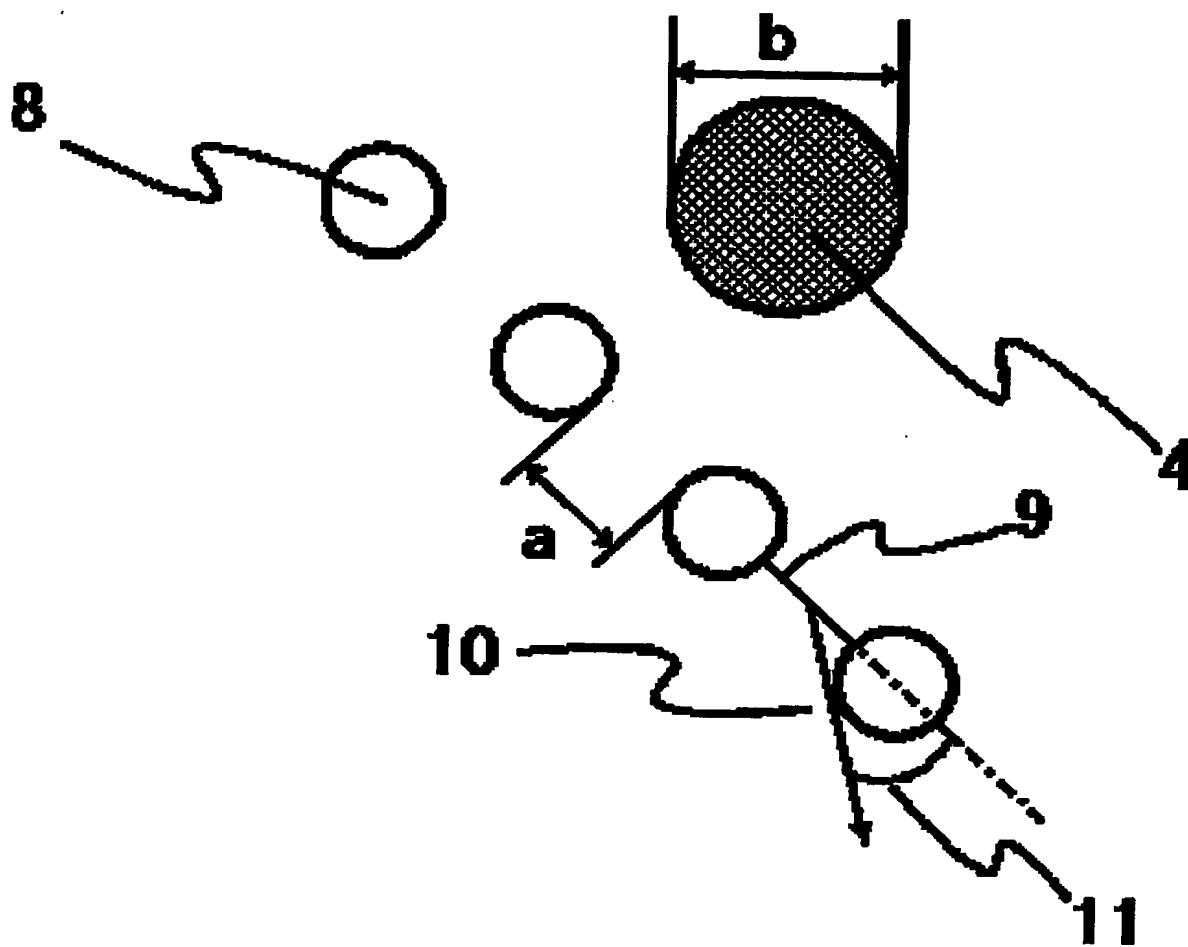


Fig.3

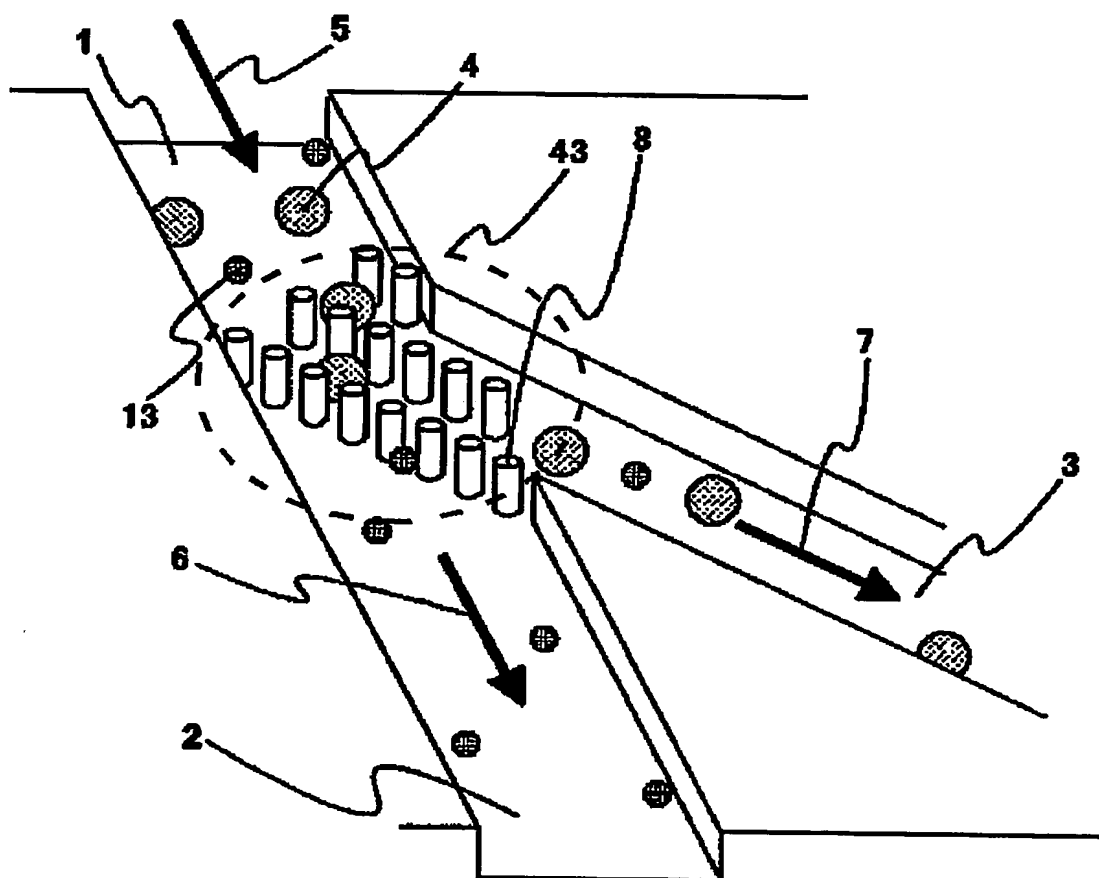


Fig.4

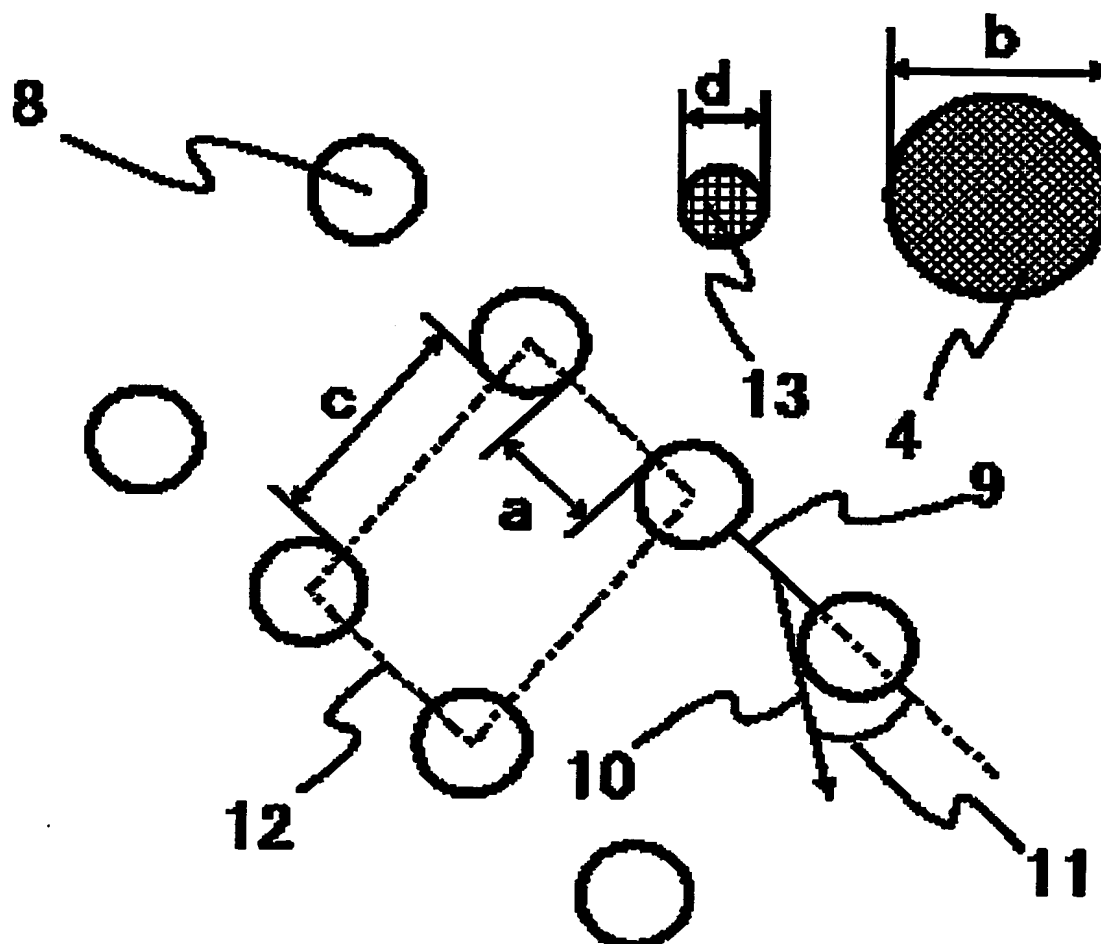


Fig.5

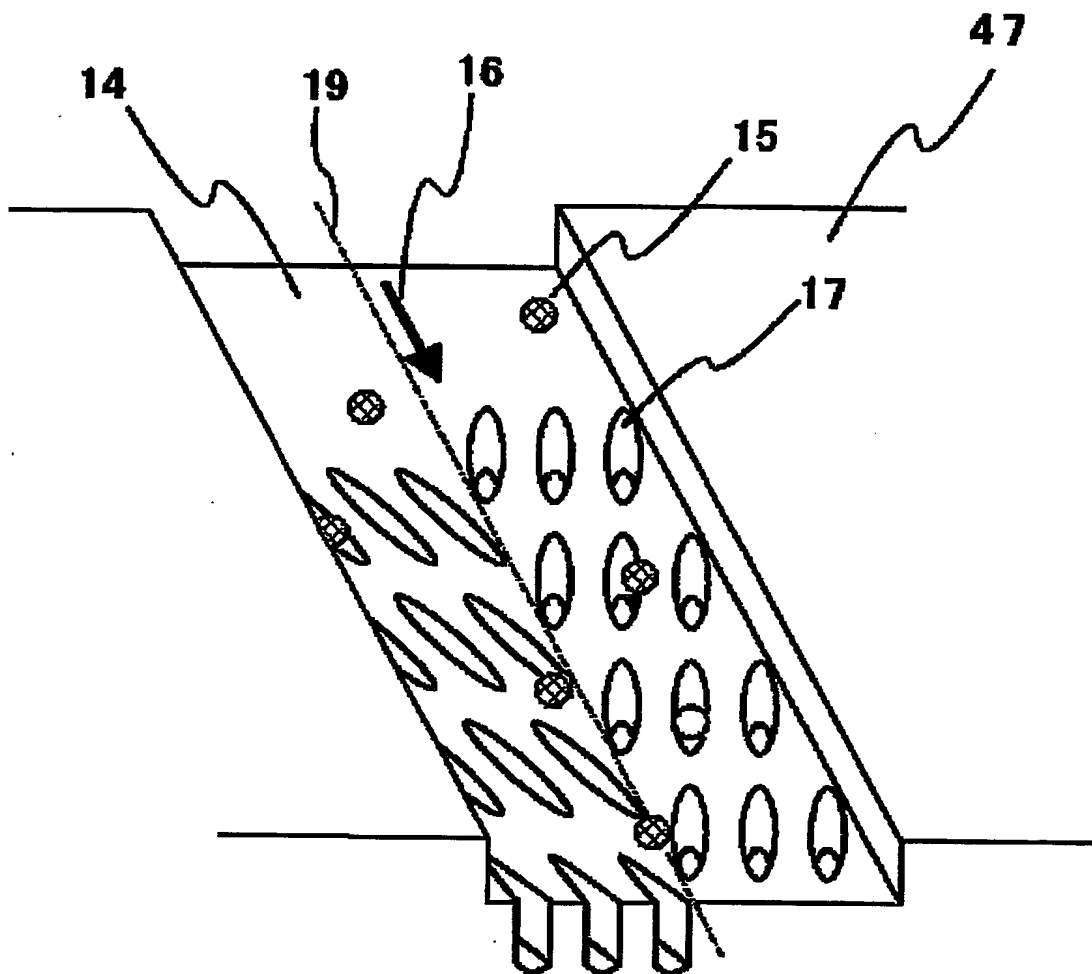


Fig.6

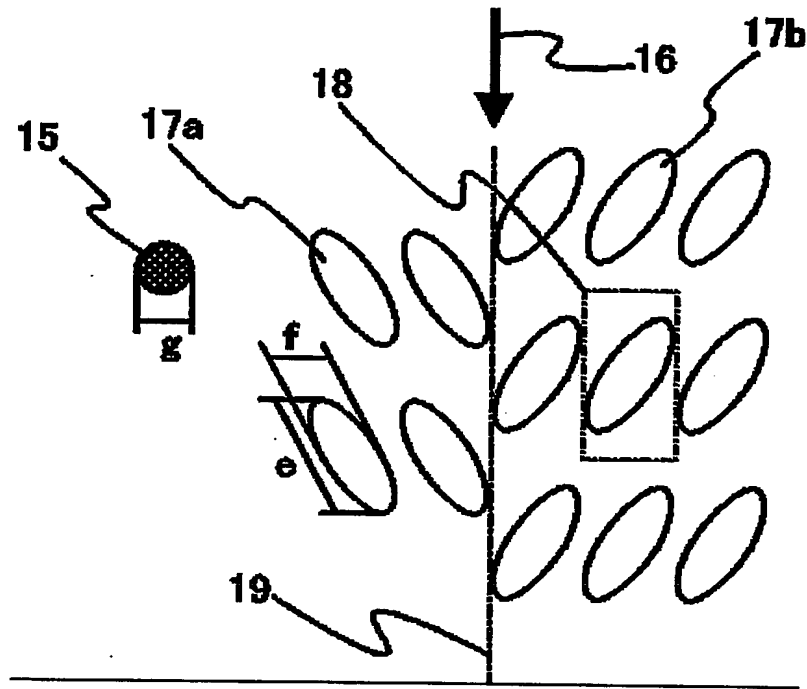


Fig.7

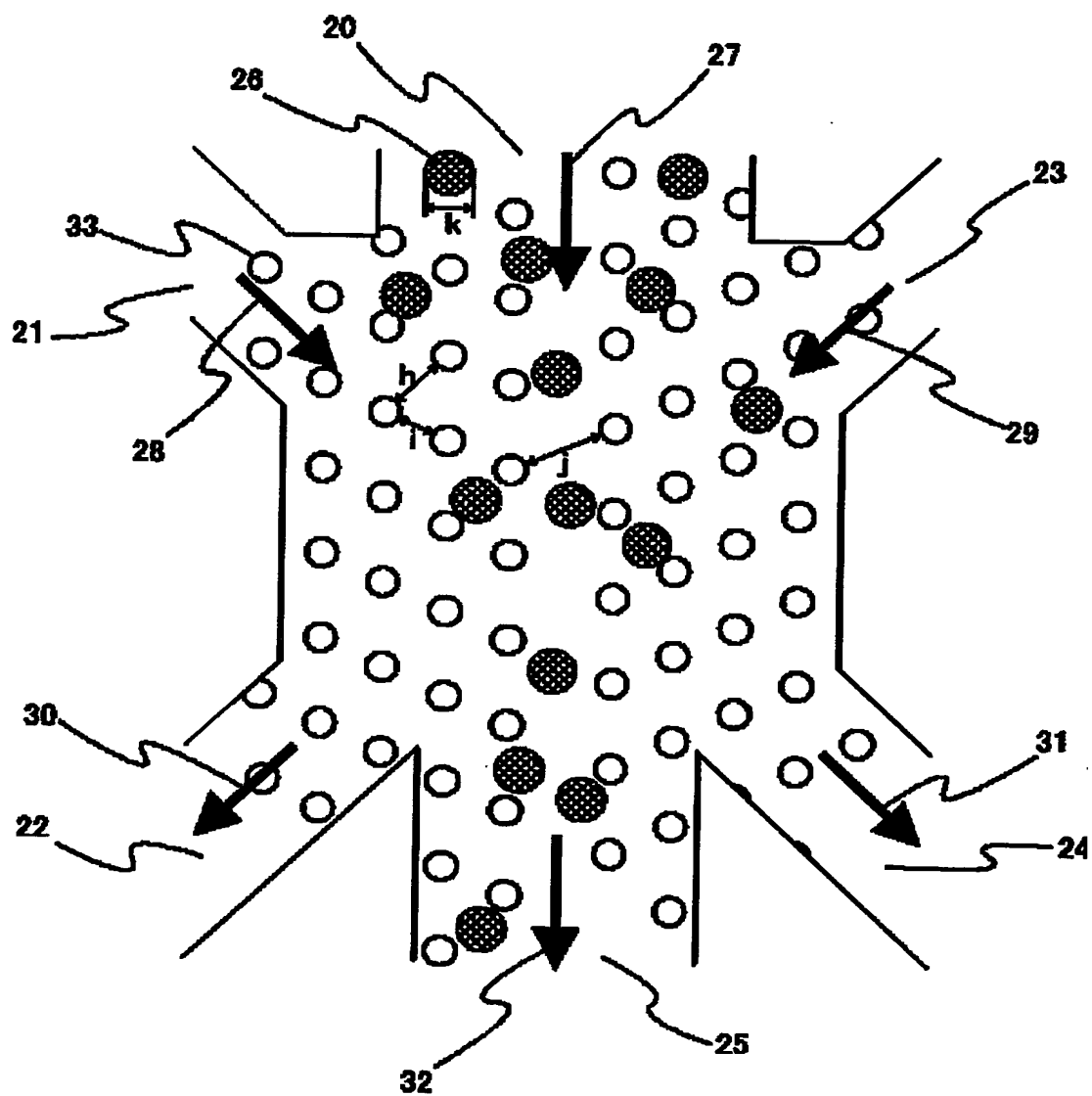


Fig.8

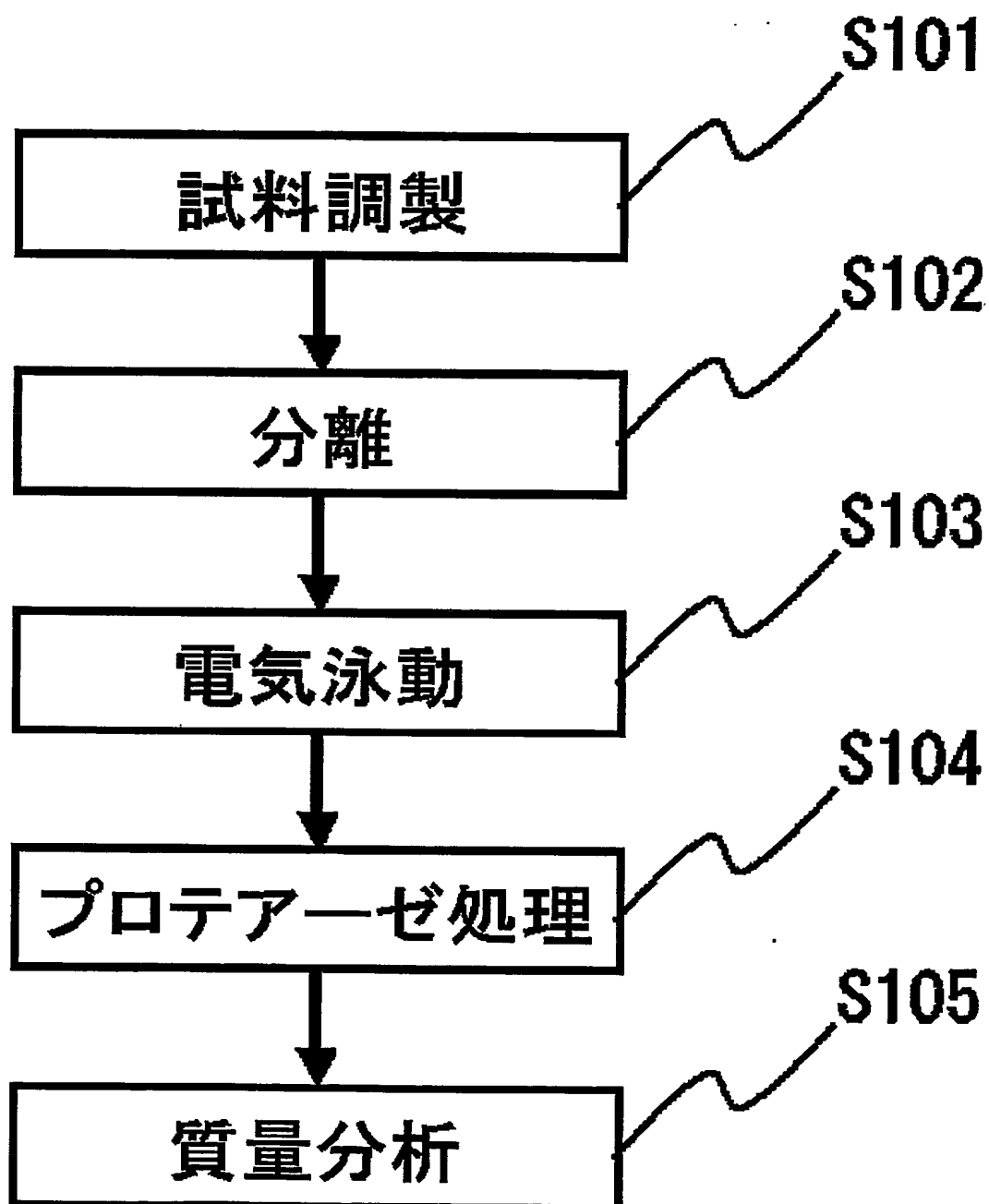


Fig.9

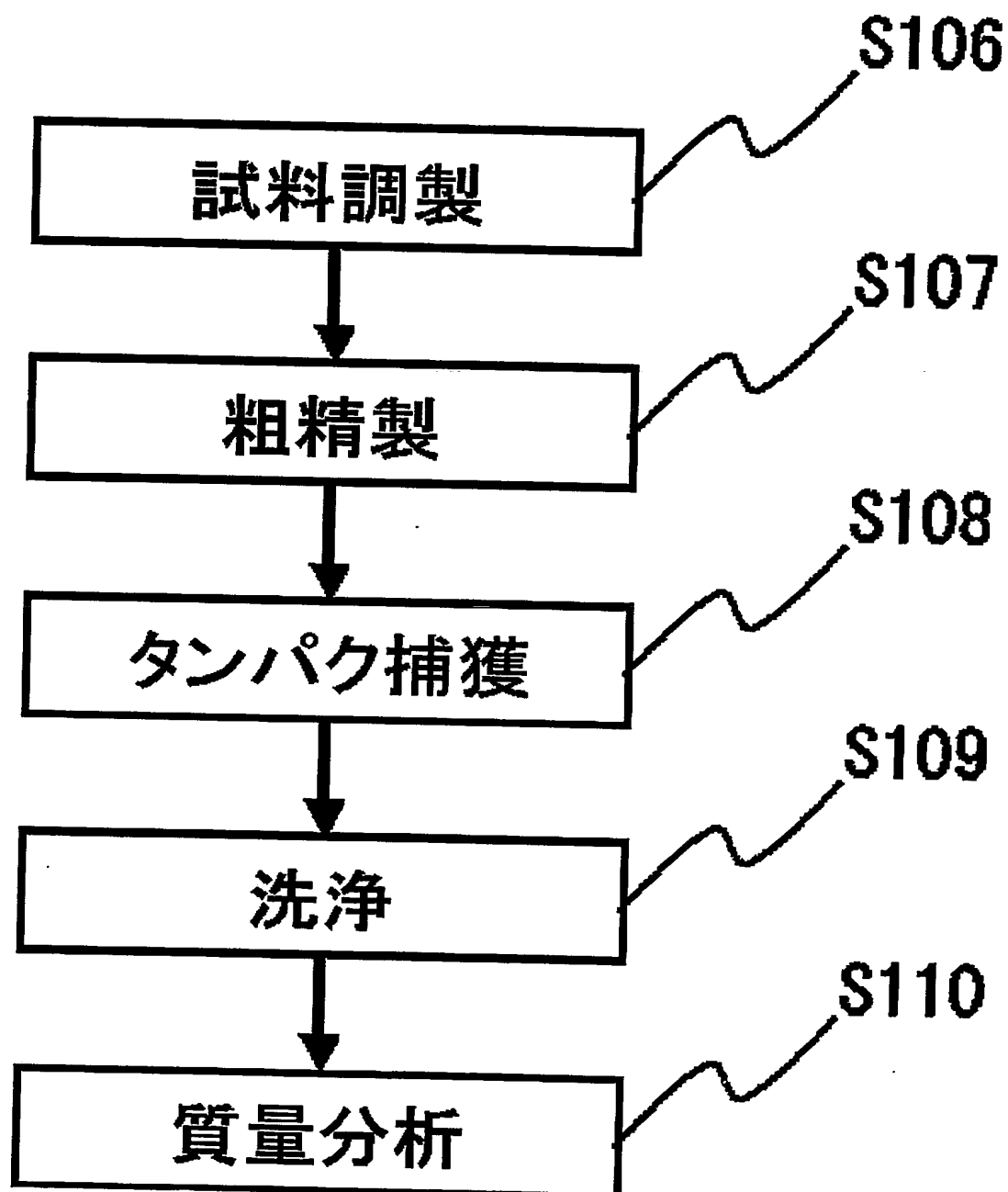


Fig.10

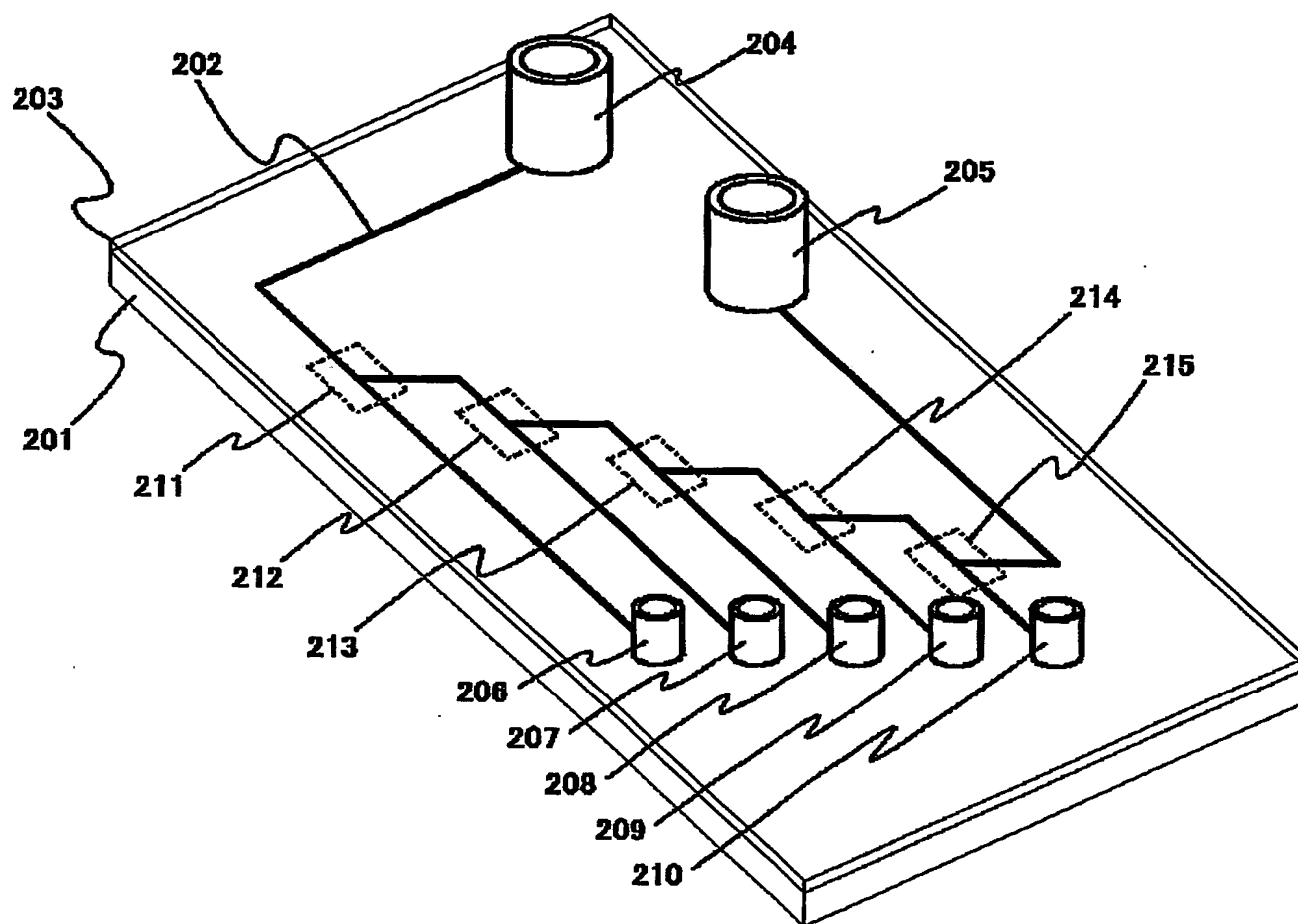


Fig.11

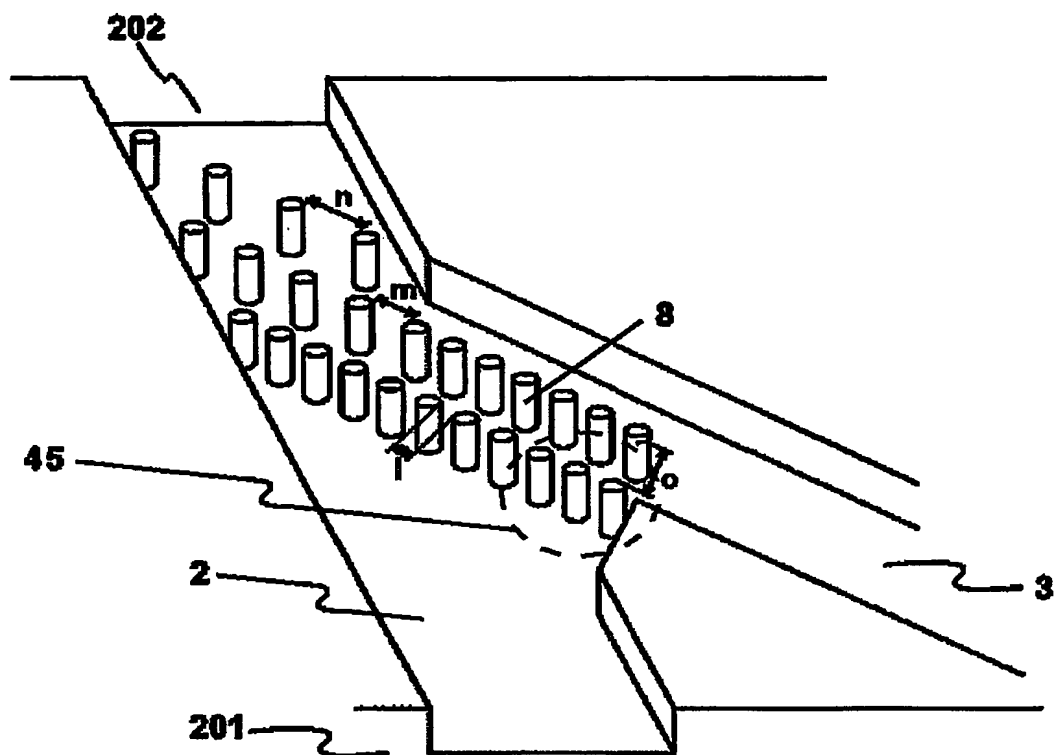


Fig.12

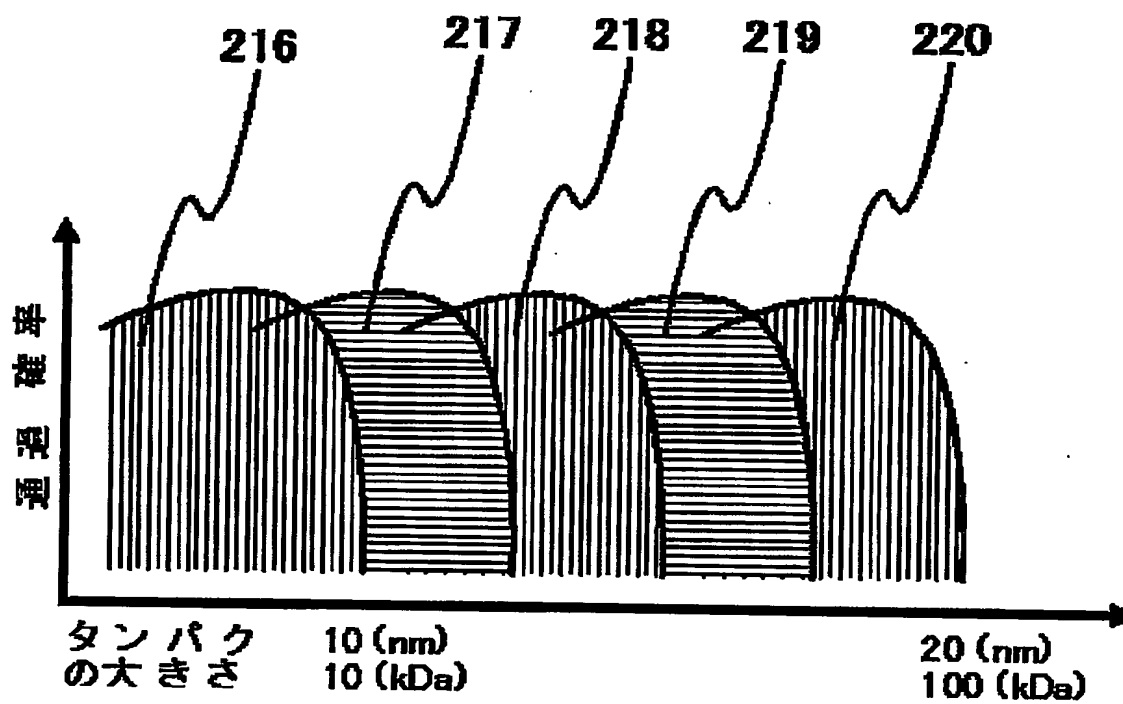


Fig.13

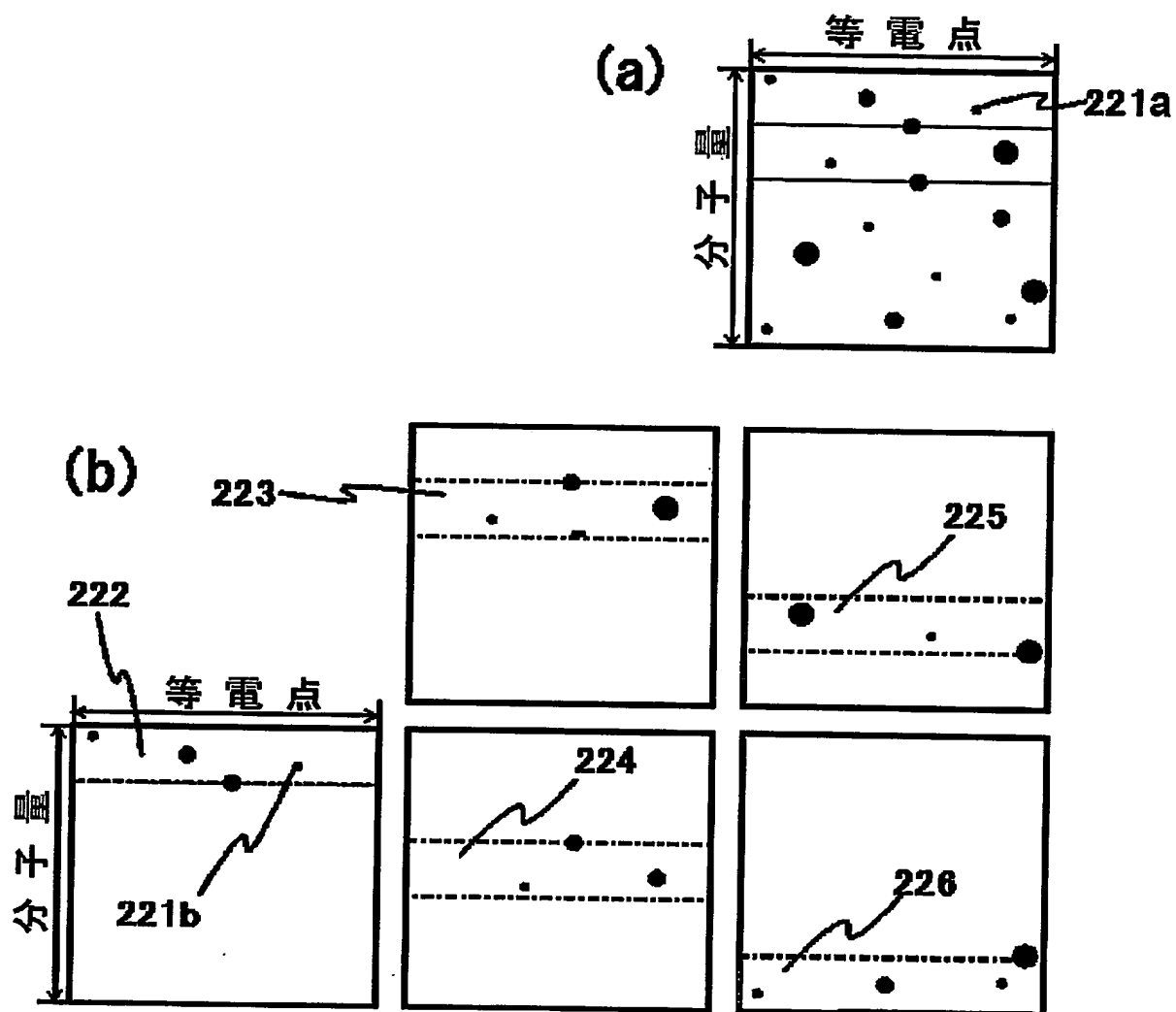


Fig.14

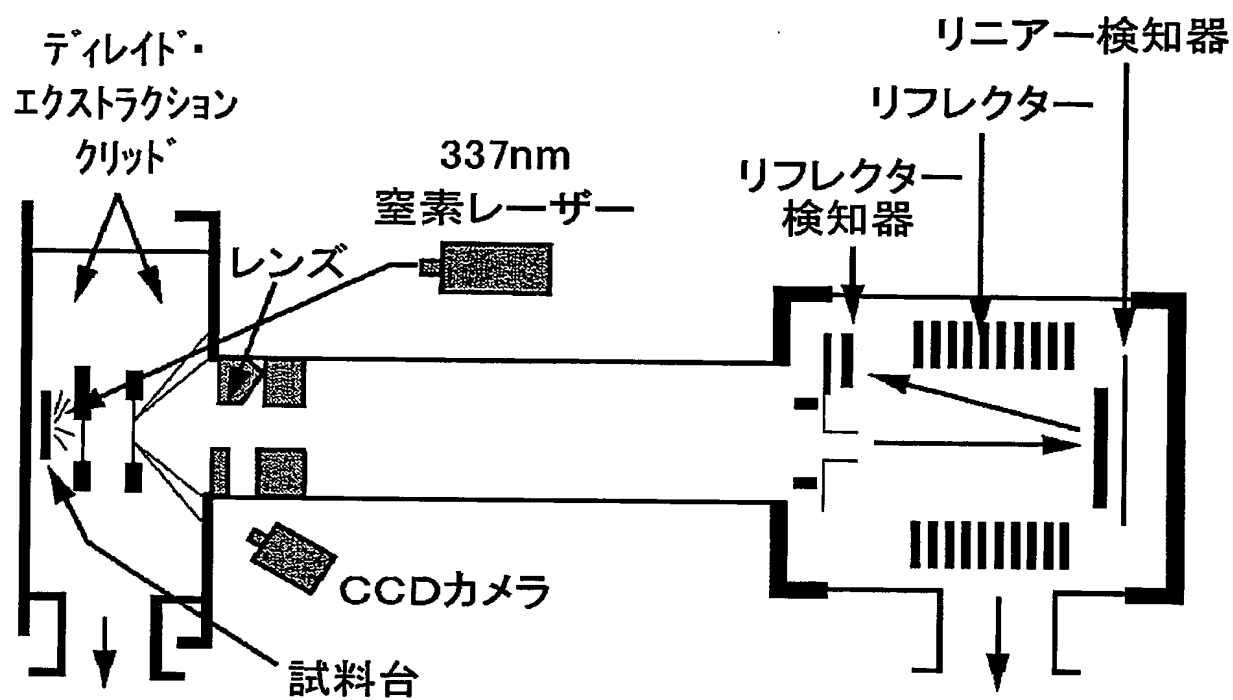


Fig.15

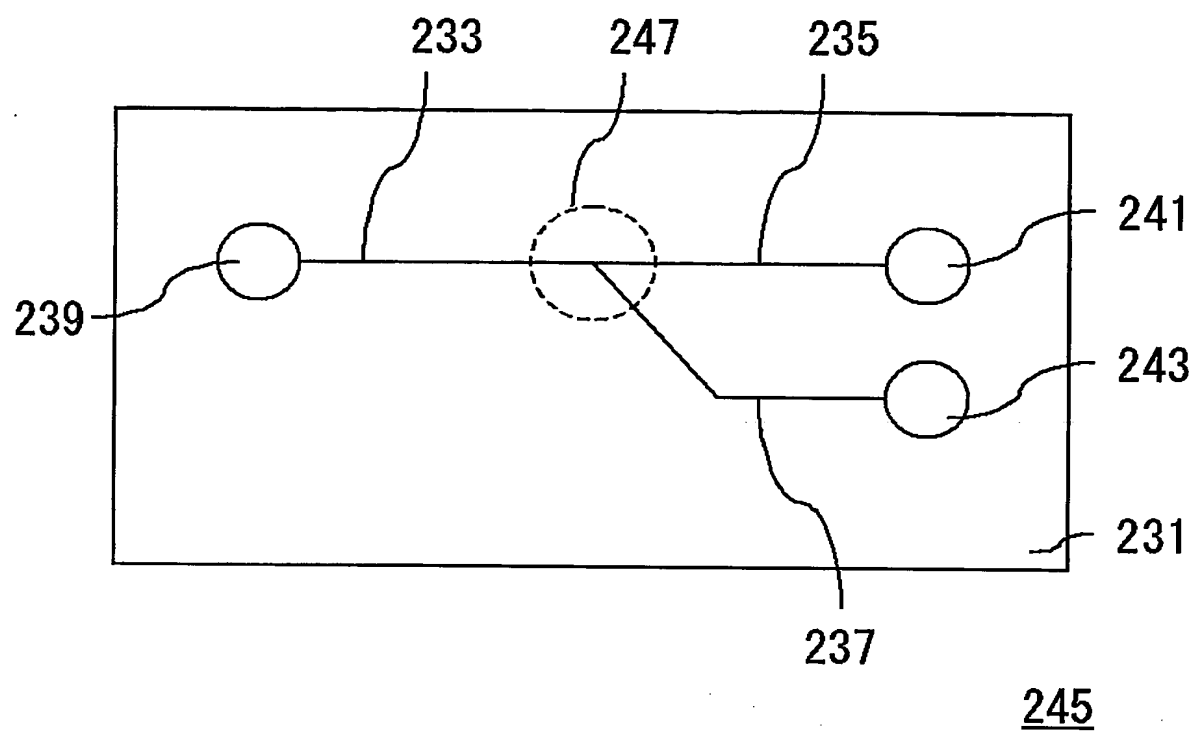


Fig.16

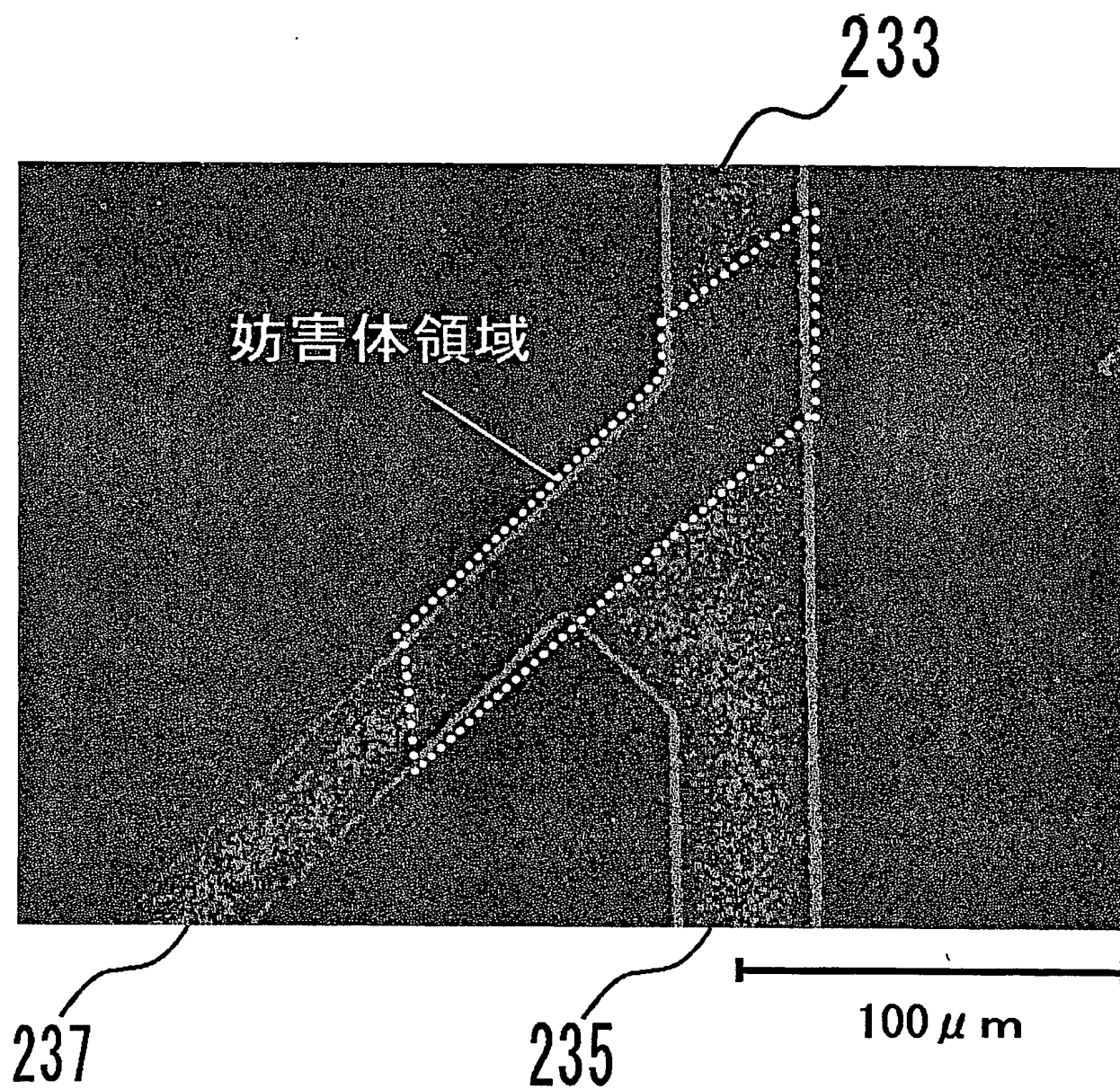


Fig.17

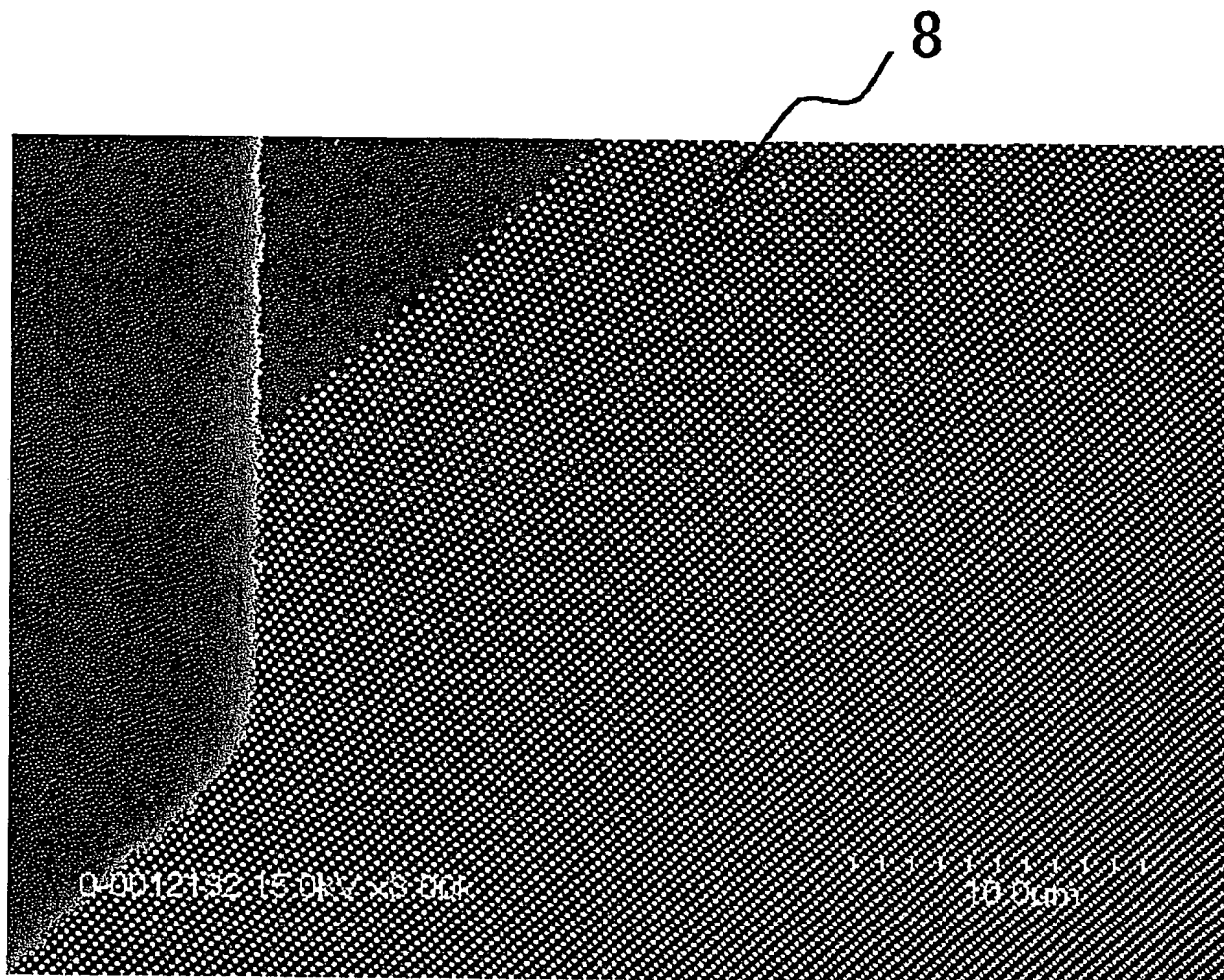


Fig.18

8

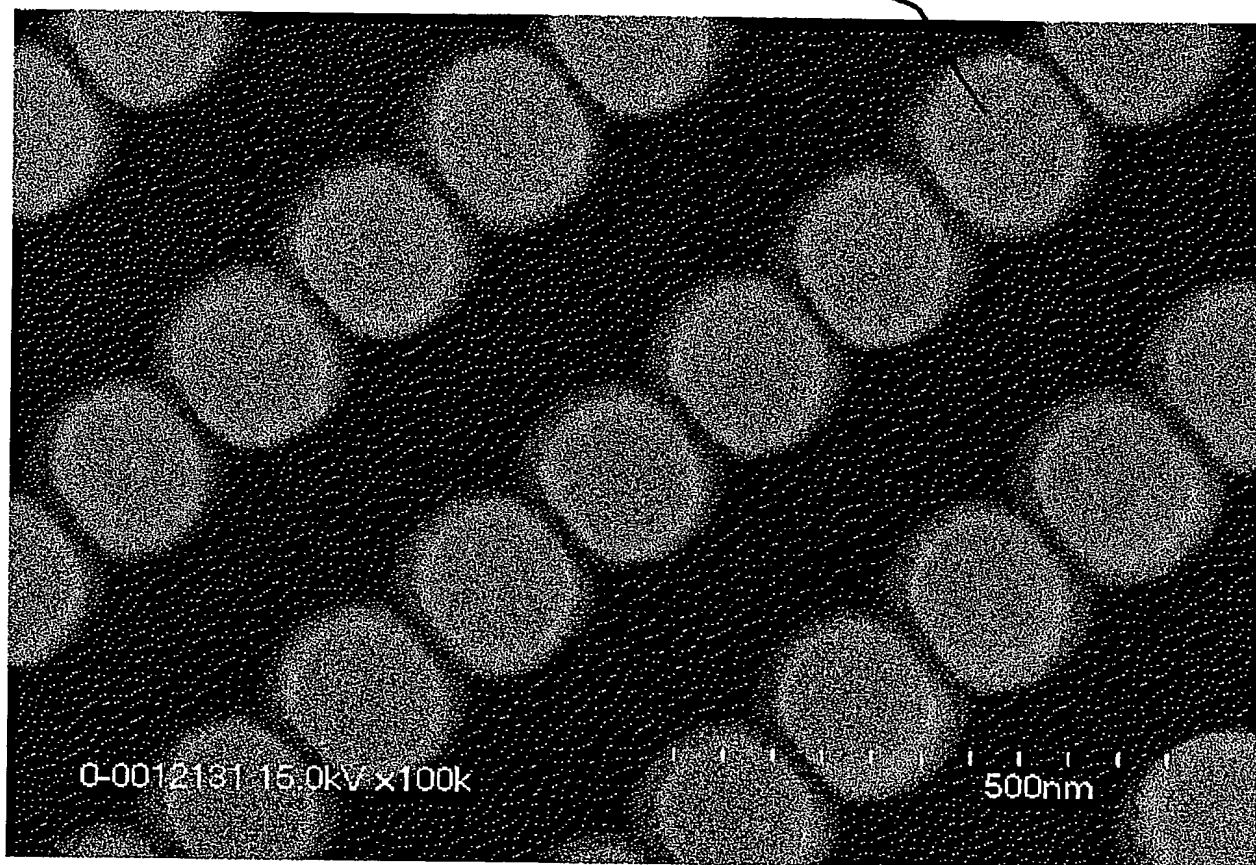
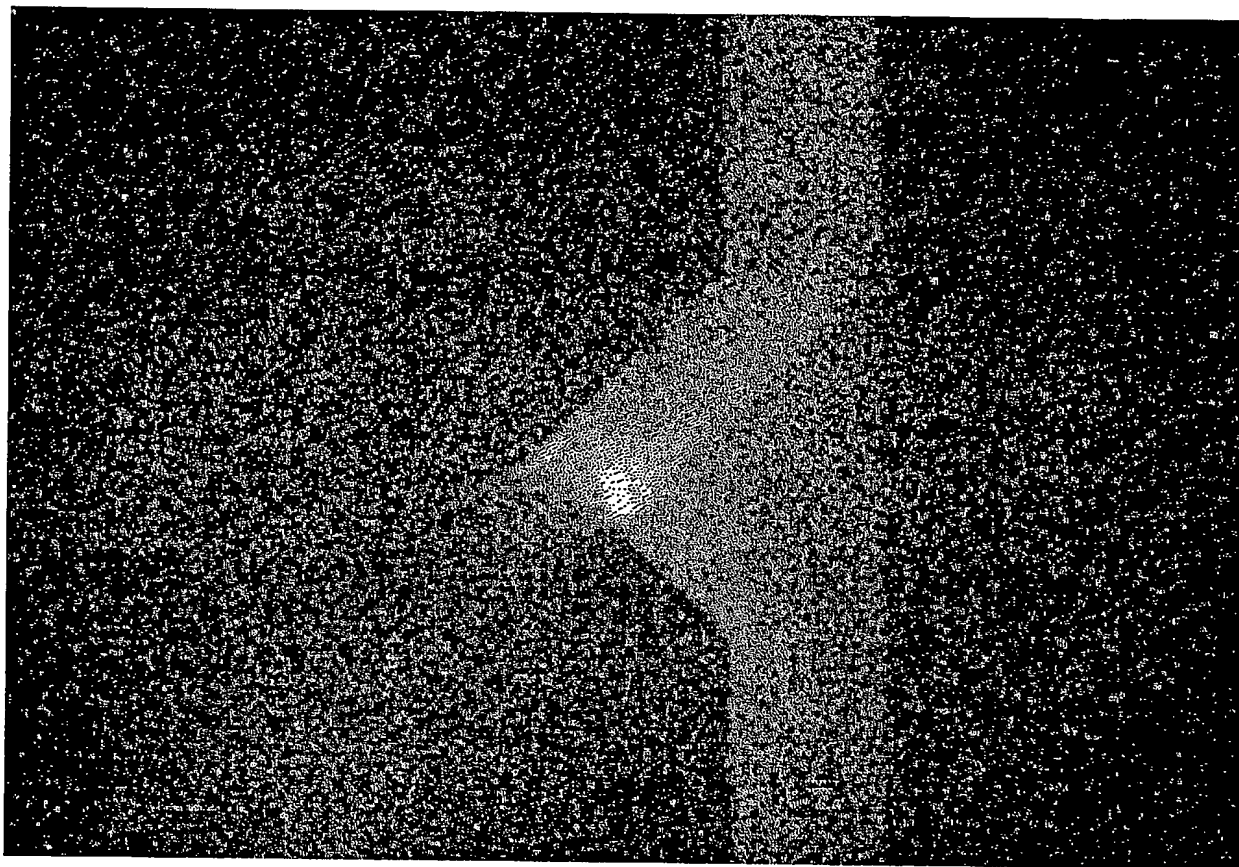


Fig.19



100 μ m

Fig.20

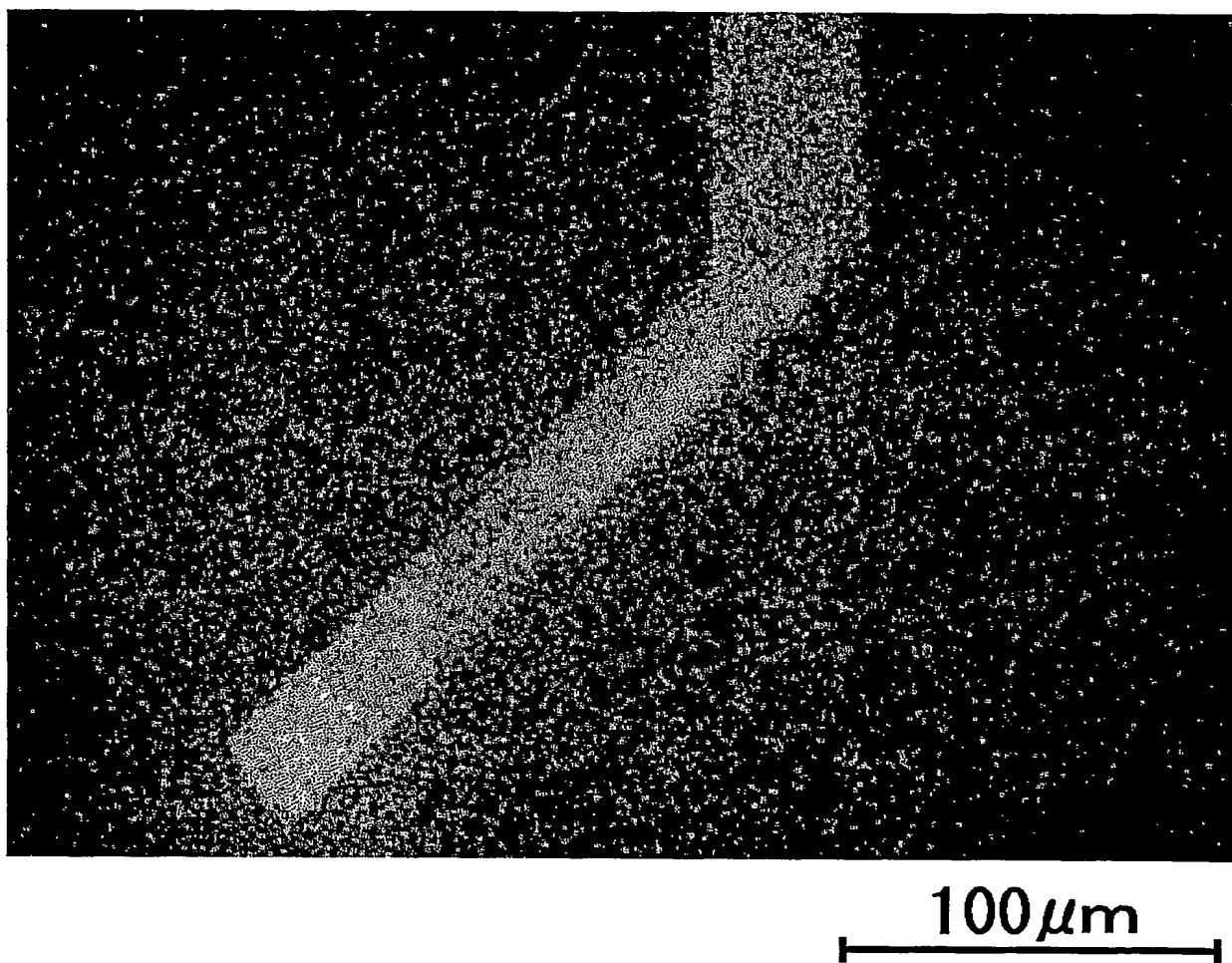


Fig.21

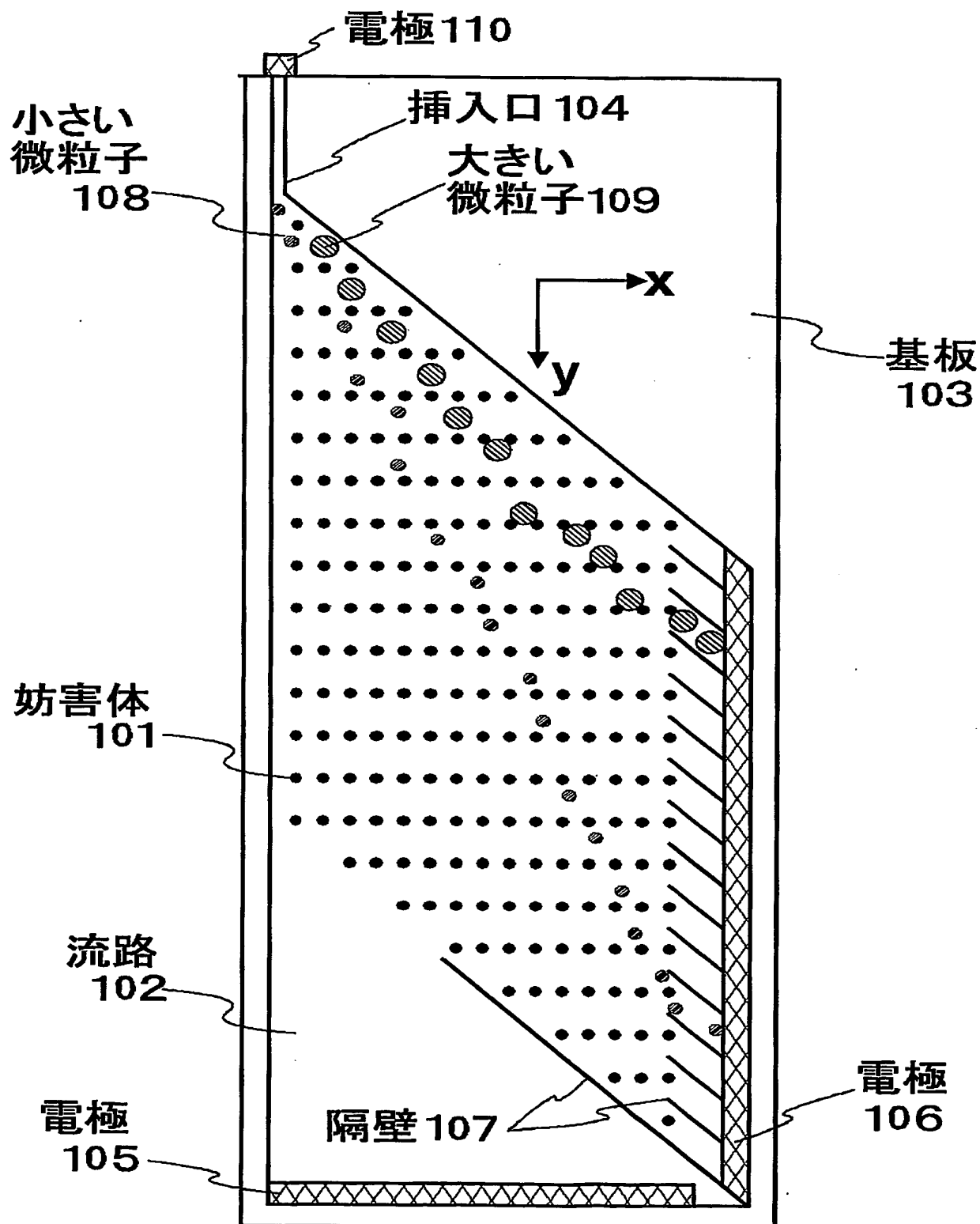


Fig.22

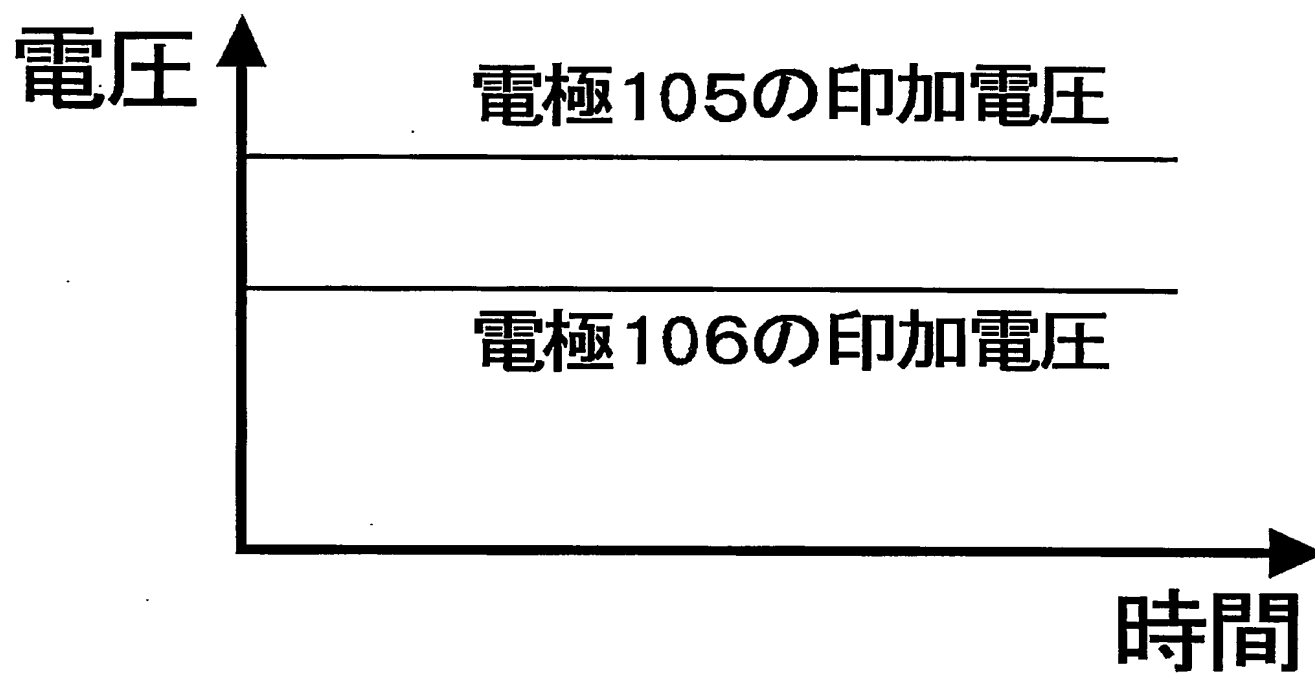


Fig.23

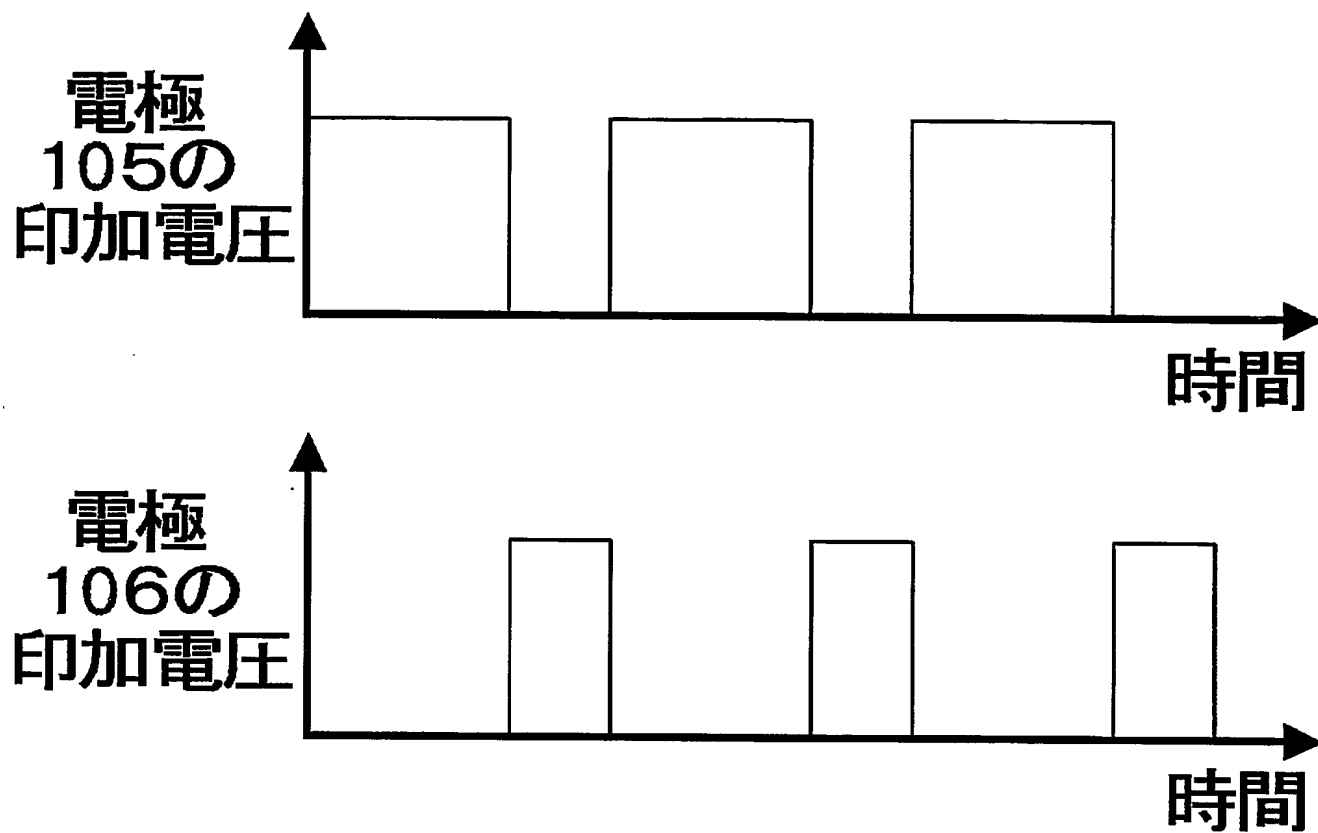
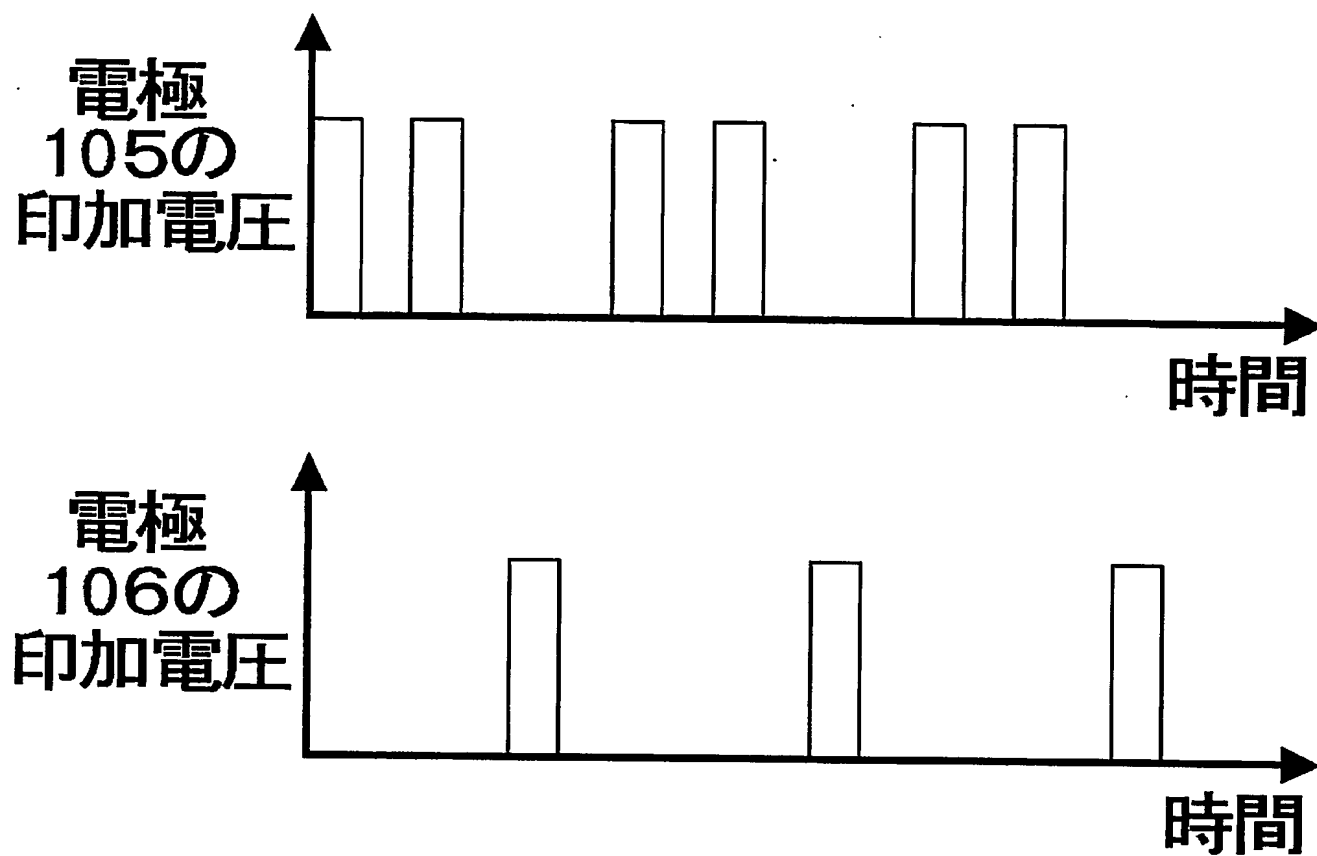


Fig.24



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15031

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N1/10, 27/26, 27/62, 33/48, 35/08, 37/00, B01D57/00, 57/02, B81C1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N1/00-1/44, 27/26-27/49, 27/62-27/68, 33/48-33/49, 35/08-35/10, 37/00, B01D57/00, 57/02, B81C1/00-B82B3/00, H01J40/00-49/48

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2004
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2004	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JOIS (JICST FILE)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	IIDA, KAWAURA, IGUCHI, SANO, BABA, Dai 63 Kai Extended Abstracts; The Japan Society of Applied Physics, separate Vol.3, 24 September, 2002 (24.09.02), page 1147 (25a-R-8)	1-27
Y	K.Iida, H.Kawaura, N.Iguchi, T.Sano, M.Baba, Sixth International Conference on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysis Systems (Micro Total Analysis Systems 2002), 03 November, 2002 (03.11.02), Vol.2, pages 627 to 629	1-27
Y	SANO, BABA, IGUCHI, IIDA, KAWAURA, SAKAMOTO, Dai 63 Kai Extended Abstracts; The Japan Society of Applied Physics, separate Vol.3, 24 September, 2002 (24.09.02), page 1146 (25a-R-8).	1-27

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 March, 2004 (16.03.04)

Date of mailing of the international search report
30 March, 2004 (30.03.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15031

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2002/023180 A (Hitachi, Ltd.), 21 March, 2002 (21.03.02), Example 4; Figs. 9 to 14 (Family: none)	1-27
Y	JP 2002-195982 A (Olympus Optical Co., Ltd.), 10 July, 2002 (10.07.02), Full text; Figs. 1 to 7 (Family: none)	1-27
A	JP 9-504362 A (British Technology Group USA Inc.), 28 April, 1997 (28.04.97), Page 24, line 13 to page 25, line 5; Fig. 7 & WO 94/029707 A1 & US 5427663 A & EP 711412 A & US 5837115 A1 & CA 2164720 A	1-27
A	Chia-Fu Chou et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 23 November, 1999 (23.11.99), Vol.96, No.24, pages 13762 to 13765	1-27
A	JP 2001-183363 A (Roche Diagnostics Corp.), 06 July, 2001 (06.07.01), Full text; Figs. 1 to 6 & EP 1096254 A & US 6319719 B & CA 2324131 A	1-27
A	JP 2001-515216 A (CEPHEID), 18 September, 2001 (18.09.01), Full text; Figs. 1 to 22 & WO 99/009042 A1 & AU 8906698 A & CA 2301309 A & EP 1003759 A & US 2001-12612 A1	1-27
A	JP 10-506991 A (Abbott Laboratories), 07 July, 1998 (07.07.98), Full text; Figs. 1 to 6 & WO 96/010747 A1 & CA 2195875 A & EP 783694 A & US 5952173 A1	1-27
A	JP 2002-524755 A (Advion Biosciences Inc.), 06 August, 2002 (06.08.02), Par. Nos. [0114] to [0191]; Figs. 25 to 49 & WO 00/015321 A1 & CA 2343055 A & AU 5800499 A & EP 1113850 A & US 123153 A1	1-27
A	JP 2002-292600 A (Mitsui Chemicals, Inc.), 08 October, 2002 (08.10.02), Full text; Figs. 1 to 5 (Family: none)	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15031

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2001-258868 A (Jun KIKUCHI), 25 September, 2001 (25.09.01), Par. No. [0016]; Fig. 8 & WO 01/069242 A1 & AU 4109101 A & EP 1267166 A	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15031

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

While the technical feature of the inventions of claims 1-22, 24-27 is handling of a flow of fine particles through formation of an obstacle portion on a channel surface, the invention of claim 23 does not involve this technical feature.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N1/10, 27/26, 27/62, 33/48, 35/08, 37/00, B01D57/00, 57/02, B81C1/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N1/00-1/44, 27/26-27/49, 27/62-27/68, 33/48-33/49, 35/08-35/10, 37/00, B01D57/00, 57/02, B81C1/00-B82B3/00, H01J40/00-49/48

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2004年
 日本国登録実用新案公報 1994-2004年
 日本国実用新案登録公報 1996-2004年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
JOIS (JICSTファイル)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	飯田、川浦、井口、佐野、馬場、第63回応用物理学会学術講演会講演予稿集 第3分冊 2002年9月24日 p.1147 (25a-R-9)	1-27
Y	K. Iida, H. Kawaura, N. Iguchi, T. Sano, M. Baba, Sixth International Conference on Miniaturized Chemical and Biochemical Analysis Systems (Micro Total Analysis Systems 2002) November 3, 2002 Vol. 2 p. 627-629	1-27
Y	佐野、馬場、井口、飯田、川浦、阪本、第63回応用物理学会学術講演会講演予稿集 第3分冊 2002年9月24日 p.1146 (25a-R-8)	1-27

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16.03.2004

国際調査報告の発送日

30.3.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高見 重雄

2J

9116

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 2002/023180 A (株式会社日立製作所) 2002. 03. 21 【実施例 4】図9-14 (ファミリーなし)	1-27
Y	JP 2002-195982 A (オリンパス光学工業株式会社) 2002. 07. 10 全文 図1-図7 (ファミリーなし)	1-27
A	JP 9-504362 A (ブリティッシュ・テクノロジー・グループ・ユースエイ・インコーポレーテッド) 1997. 04. 28 第24頁第13行-第25頁第5行 図7 & WO 94/029707 A1 & US 5427663 A & EP 711412 A & US 5837115 A1 & CA 2164720 A	1-27
A	Chia-Fu Chou et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, November 23, 1999 Vol. 96 No. 24 p. 13762-13765	1-27
A	JP2001-183363 A (ロシュ・ダイアグノスティクス・コーポレーション) 2001. 07. 06 全文 図1-図6 & EP 1096254 A & US 6319719 B & CA 2324131 A	1-27
A	JP2001-515216 A (シーフィード) 2001. 09. 18 全文 図1-図22 & WO 99/009042 A1 & AU 8906698 A & CA 2301309 A & EP 1003759 A & US 2001-12612 A1	1-27
A	JP10-506991 A (アボット・ラボラトリーズ) 1998. 07. 07 全文 図1-図6 & WO 96/010747 A1 & CA 2195875 A & EP 783694 A & US 5952173 A1	1-27
A	JP2002-524755 A (アドヴァイオン バイオサイエンス インコーポレーテッド) 2002. 08. 06 【0114】 - 【0191】 図25-図49 & WO 00/015321 A1 & CA 2343055 A & AU 5800499 A & EP 1113850 A & US 123153 A1	1-27
A	JP2002-292600 A (三井化学株式会社) 2002. 10. 08 全文 図1-図5 (ファミリーなし)	1-27
A	JP2001-258868 A (菊地純) 2001. 09. 25 【0016】 図8 & WO 01/069242 A1 & AU 4109101 A & EP 1267166 A	1-27

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求の範囲 1-22、24-27に記載された発明は、流路表面に妨害部を形成することにより、微粒子の流れを操作することを技術的特徴点としているのに対し、請求の範囲 23に記載された発明は、該技術的特徴点を有さない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。